Razvoj metode za određivanje amilaza u sladu direktnom potenciometrijom

Karnaš, Maja

Master's thesis / Diplomski rad

2014

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:182:788167

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Department of Chemistry, Osijek



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

ODJEL ZA KEMIJU

Diplomski nastavnički studij kemije

Maja Karnaš

Razvoj metode za određivanje amilaza u sladu direktnom potenciometrijom

Diplomski rad

Osijek, 2014.

Zahvaljujem se svome mentoru, doc.dr.sc. Nikoli Sakaču, na uloženom trudu, vremenu i potpori tijekom izvođenja eksperimentalnog dijela rada, kao i na stručnome vodstvu i korisnim savjetima tijekom pisanja samog rada.

Također, zahvaljujem se svima koji su, na bilo koji način, pomogli pri izradi ovoga rada, na svim savjetima, preporukama i kritikama iz kojih sam najviše naučila.

Veliko hvala i svim profesorima, asistentima, tehničarima i studentskim kolegama, kako na prenesenom znanju, tako i na podršci tijekom studiranja.

Na kraju, hvala i svim mojim prijateljima, mojoj „proširenoj“ obitelji i mojoj ljubavi na potpori i strpljenju.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA **Diplomski rad**

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Odjel za kemiju
Diplomski studij kemije
Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Kemija

RAZVOJ METODE ZA ODREĐIVANJE AMILAZA U SLADU DIREKTNOM POTENCIOMETRIJOM

Maja Karnaš

Rad je izrađen na: Odjel za kemiju (Zavod za analitičku i primijenjenu kemiju)

Mentor: Doc.dr.sc. Nikola Sakač

SAŽETAK

Slad je produkt žitarica, najčešće ječma, koji se koristi u pićima i hrani kao podloga za fermentaciju te za dodavanje okusa. Dobiva se klijanjem ječma u kontroliranim uvjetima što omogućava sintezu enzima amilaza, koje embrio biljke koristi za razgradnju škroba.

Amilaze su enzimi koji kataliziraju hidrolizu škroba na jednostavnije ugljikohidrate. U ječmu se nalaze dvije vrste amilaza, alfa i beta amilaze, koje se razlikuju po načinu razgradnje škroba. Aktivnost alfa amilaze u sladu ključni je parametar kvalitete za žitarice i brašno u prehrambenoj industriji, posebice u proizvodnji piva i fermentaciji. Također, različite koncentracije alfa amilaze koriste se za modifikaciju svojstava tijesta što uvelike utječe na kvalitetu pečenih proizvoda.

U ovom je radu predložena elektrokemijska metoda za određivanje aktivnosti amilaza u sladu. Metoda je temeljena na direktnom potenciometrijskom mjerenju koncentracije trijodidnih iona oslobođenih iz škrob-trijodid kompleksa nakon razgradnje škroba pomoću amilaza iz slada. Kao detektor trijodidnih iona predložena je platinska redoks elektroda. U odnosu na druge dostupne metode, ovaj princip određivanja je jednostavan, brz, jeftin i ne zahtjeva specifične reagense i aparaturu. Rad također sadrži i metodički dio s prijedlogom pripreme za nastavni sat kemije u osnovnoj školi, uključujući i radne listiće s pokusima na temu enzimi.

Diplomski rad obuhvaća: 58 stranica, 18 slika, 5 tablica, 33 literaturna navoda i 0 priloga.
Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: α-amilaza/amilazna aktivnost/direktna potenciometrija/ječmeni slad

Datum obrane: 13. listopada 2014.

Stručno povjerenstvo za ocjenu:

1. prof.dr.sc. Milan Sak-Bosnar
2. doc.dr.sc. Nikola Sakač
3. prof.dr.sc. Ivan Vicković

Rad je pohranjen: Knjižnica Odjela za kemiju

BASIC DOCUMENTATION CARD **Graduate thesis**

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Department of Chemistry
Graduate Study of Chemistry
Scientific Area: Natural Sciences
Scientific Field: Chemistry

DEVELOPMENT OF A DIRECT POTENTIOMETRIC METHOD FOR THE DETERMINATION OF AMYLASE ACTIVITY IN BARLEY MALT

Maja Karnaš

Thesis completed at: Department of Chemistry

Supervisor: Nikola Sakač, assistant professor

ABSTRACT

Malt is a grain product, mostly barley, used in beverages and foods as a basis for fermentation and to add flavour. The malt is obtained in barley grain germinating process under controlled conditions that enables the synthesis of amylase enzymes which are used later by plant embryo in order to breakdown starch molecules.

Amylases are enzymes that catalyze hydrolysis of starch into smaller carbohydrate molecules. Two main subtypes of amylases can be found in barley malt, alpha and beta, that differ in the way they breakdown the starch molecules. The level of alpha-amylase in malt is a key quality parameter for grains and flour in food industry, mainly in beer production and fermentation. Furthermore, variable concentrations of alpha-amylase are used to modify dough properties, thus influencing the quality of the baked products.

The proposed electrochemical method in this paper is based on direct potentiometric determination of levels of triiodide ion released from the starch–triiodide complex after starch degradation by barley malt amylases. A platinum redox electrode is proposed as a detector of triiodide ions. When compared to other available methods, this principle is simple, rapid, inexpensive and doesn't require specific reagents and apparatus. In the teaching part of the thesis a preparation lecture on enzymes for the elementary school chemistry class is proposed. The lecture includes some relevant experiments, questionnaires and handouts.

Thesis includes: 58 pages, 18 figures, 5 tables, 33 references, 0 appendices
Original in: Croatian

Keywords: α-amylase/amylase activity/barley malt/direct potentiometry
Thesis defence: October 13th, 2014

Reviewers:

1. dr.sc. Milan Sak-Bosnar, Full Professor
2. dr.sc. Nikola Sakač, Assistant Professor
3. dr.sc. Ivan Vicković, Full Professor

Thesis deposited in: Department of Chemistry library

SADRŽAJ

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA I
BASIC DOCUMENTATION CARD II
SADRŽAJ III
1. UVOD 1
2. LITERATURNI PREGLED 2
2.1. SLAD 2
2.1.1. SLAD U PROIZVODNJI PIVA 3
2.1.2. JEČMENI SLAD 5
2.2. AMILAZE 6
2.2.1. α−AMILAZE 7
2.2.2. β−AMILAZE 8
2.3. ODREĐIVANJE AMILAZA 9
2.3.1. SPEKTROFOTOMETRIJSKE METODE 10
2.3.2. ELEKTROANALITIČKE METODE 11
2.3.3. ODREĐIVANJE AMILAZA U SLADU 11
2.4. ŠKROB 13
2.4.1. AMILOZA 14
2.4.2. AMILOPEKTIN 15
2.5. TRIJODIDNI ION 17
2.5.1. NASTAJANJE KOMPLEKSA ŠKROB-TRIJODID 18
2.5.2. ŠKROB - INDIKATOR ZA JOD 19
2.6. POTENCIOMETRIJA 20
2.6.1. DIREKTNA POTENCIOMETRIJA 24
3. EKSPERIMENTALNI DIO 25
3.1. REAGENSI I INSTRUMENTACIJA 25
3.2. PRIPREMA OTOPINA 26
3.3. POSTUPAK 28
3.3.1. UTJECAJ TEMPERATURE I pH VRIJEDNOSTI 29
3.3.2. NEFILTRIRANI EKSTRAKT SLADA 29
3.3.3. UTJECAJ UDJELA α-AMILAZE 30
3.3.4. PHADEBAS TEST 30

4. REZULTATI I RASPRAVA 31

4.1. POTENCIOMETRIJSKA STUDIJA SUSTAVA ŠKROB-EKSTRAKT SLADA / AMILAZE-TRIJODID 31

4.2. OVISNOST POTENCIJALA SUSTAVA ŠKROB - EKSTRAKT SLADA - TRIJODID O KONCENTRACIJI SLADA / AMILAZE I VREMENU INKUBACIJE 33

4.3. RAZLIKA U MJERENJIMA IZMEĐU FILTRIRANIH I NEFILTRIRANIH UZORAKA SLADA 35

4.4. UTJECAJ TEMPERATURE, pH VRIJEDNOSTI I PRISUTNOSTI KALCIJEVIH IONA NA PONAŠANJE α- I β- AMILAZE 37

4.5. OVISNOST POTENCIJALA SUSTAVA ŠKROB-SMJESA α- I β-AMILAZE-TRIJODID O RAZLIČITIM UDJELIMA AMILAZA 38

4.6. OVISNOST POTENCIJALA O KONCENTRACIJI I VREMENU INKUBACIJE ZA RAZLIČITE UZORKE SLADOVA 39

4.7. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI α-AMILAZE IZ SLADA MJERENJEM OVISNOSTI POTENCIJALA SUSTAVA O VREMENU INKUBACIJE – USPOREDBA S PHADEBAS TESTOM 41

5. ZAKLJUČAK 45

6. METODIČKI DIO 46

6.1. PRIPREMA ZA IZVOĐENJE NASTAVNOG SATA 46

6.2. STRUKTURA NASTAVNOG SATA 47

6.3. PLAN PLOČE I RADNI LISTIĆI UZ POKUSE 49

7. LITERATURA 55

8. ŽIVOTOPIS 58

1. UVOD

Slad je žitarica proklijala u kontroliranim uvjetima. Za dobivanje većine slada od žitarica koristi se ječam, ali također se mogu koristiti pšenica, raž ili zob. Bit proizvodnje slada je razgradnja škroba koji se nalazi u zrnima žitarica pomoću enzima amilaza. Ječmeni slad osnovna je sirovina za proizvodnju piva.

Amilaze su enzimi koji kataliziraju hidrolizu škroba pri čemu nastaju jednostavniji šećeri, glukoza, maltoza, maltotrioza i viši dekstrini. Prema produktima dijele se u nekoliko podvrsta od kojih je u sladu najzastupljenija alfa amilaza. Svoju primjenu nalaze u industrijskoj hidrolizi škroba u šećere, u prehrambenoj industriji, industriji detergenata, pekarstvu, proizvodnji piva, sokova i drugih napitaka.

Supstrat za alfa amilazu u sladu je škrob. Škrob je jedan od glavnih rezervi energije kod biljaka. Po kemijskom sastavu on je smjesa dvaju polimera D-glukoze, amiloze i amilopektina. Najpoznatija reakcija za dokazivanje škroba je pomoću otopine trijodida ili Lugolove otopine. Ako je u uzorku prisutan škrob stvori se tamno plavo ili smeđe obojenje zbog nastalog kompleksa.

Cilj je ovoga rada razviti i optimizirati novu, brzu i jeftinu metodu za određivanje aktivnosti amilaze u industrijskim uzorcima slada upotrebom potenciometrijskog senzora.

Istraživanje se temelji na činjenici da alfa amilaza iz slada katalizira razgradnju škroba. Nehidrolizirani škrob slobodno stvara kompleks s trijodidnim ionom, pri čemu se smanjuje početna koncentracija trijodida. Hipoteza rada je da se promjenom koncentracije trijodida mijenja elektrodni potencijal platinske elektrode, a navedena promjena u korelaciji je s koncentracijom alfa amilaze, a samim time i njenom aktivnošću.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. SLAD

Slad je najbitniji sastojak piva. On određuje njegov okus, boju, gustoću i jačinu. Proces pretvorbe ječma u slad najbitniji je za dobivanje piva. Slad sadrži veliku količinu amilaza koje sudjeluju pri hidrolizi škroba u niže šećere tijekom proizvodnje piva. Slad se može napraviti i od drugih žitarica osim ječma, na primjer od zobi, pšenice ili raži. Ječam stvara najviše šećera pa mu je pivarska industrija sklonija.[1]

Postoji nekoliko faza u proizvodnji slada. Prvo se zrnje potapa u vodu pri temperaturi od 10 do 18°C kako bi došlo do klijanja. Zatim se suši i prži na 3 do 5 % vlage da bi se spriječilo daljnje klijanje. U ovisnosti o duljini prženja dobit će se slad koji će dati svijetla ili crna piva (Sl.1.). [2]



Slika 1. *Utjecaj duljine prženja na boju slada i konačnog produkta* [3]

Sladove možemo podijeliti u dvije skupine: osnovni slad (sadrži dovoljno enzima za konverziju škroba) i specijalni slad (sadrži manju količina enzima i koristi se kako bi pivu dao poseban okus i boju).[4]

2.1.1. SLAD U PROIZVODNJI PIVA

Ukomljavanje je postupak miješanja mljevenog slada s toplom vodom u cilju prevođenja njegovih netopljivih sastojaka u topljiv oblik enzimskom hidrolizom pomoću enzima sintetiziranih tijekom klijanja ječma (slađenja). Tijekom hidrolize za svaki enzim treba osigurati vrijednosti pH i temperature za njihovo optimalno djelovanje. S obzirom na kemijski sastav slada najvažnije reakcije su enzimska razgradnja škroba, β-glukana i proteina.[5]

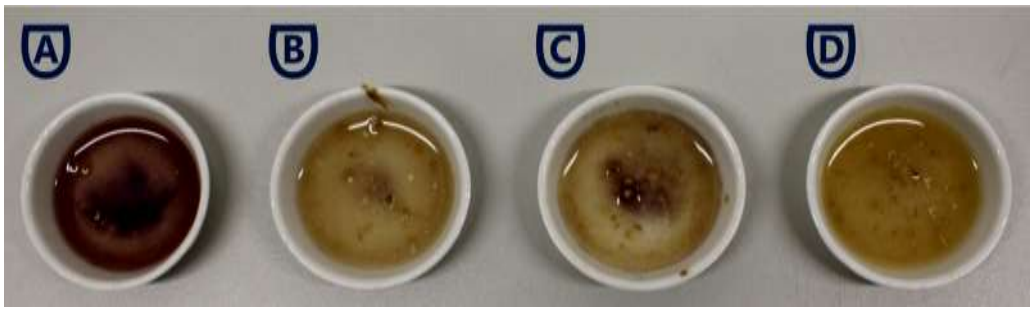
Proces se odvija u tri faze koje se međusobno preklapaju:

- ***klajsterizacija*** - prevođenje škroba u ljepljivu viskoznu smjesu
- ***likvefakcija*** - otapanje dobivene smjese u vodi
- ***šećerenje*** - razgradnja otopljene smjese do građevnih šećernih jedinica.

Kada je škrobna sirovina (slad) suspendirana u vodi, škrobne molekule vežu vodu. Škrobna zrnca tada bubre i njihova ovojnica puca, pa škrob prelazi u ljepljivu viskoznu smjesu na koju mogu djelovati enzimi. Kako je ovojnica oko škrobnih zrnaca u sladnom zrnu razgrađena djelovanjem citolitičkih i proteolitičkih enzima, proces klajsterizacije vrlo je brz. [5]

Nakon toga započinje otapanje škroba kao posljedica hidrolize pomoću amilaza koje razgrađuju lance amiloze i amilopektina.

Tijek hidrolize škroba obično se nadzire pomoću jodne probe. Mala količina uzorka nanese se na keramičku pločicu i prelije s nekoliko kapi 0,2 M otopine joda i kalijevog jodida u alkoholu. Škrob s jodom daje plavo obojenje, makromolekulski dekstrini ljubičasto, a niskomolekulski crveno. Jednostavni šećeri (glukoza, maltoza i maltotrioza) sa škrobom tvore žutosmeđe obojenje, tj. boja otopina joda ostaje nepromijenjena. [6] Takva se boja naziva jod-normalna boja (Sl.2.).



Slika 2. *Tijek hidrolize praćen jodnom probom; A-početak hidrolize, visoka koncentracija škroba; B i C-uzorci nakon nekog vremena pokazuju sve manju koncentracij škroba; D-kraj hidrolize, jod-normalna boja* [7]

Koliko će pojedinih šećera nastati hidrolizom škroba ovisi o:

- temperaturi
- vremenu zadržavanja pri odabranoj temperaturi
- pH vrijednosti
- udjelu suhe tvari u vodenoj suspenziji, odnosno otopini.

Različite temperature rezultiraju sladovinom veće ili manje fermentabilnosti, tj. udjelom šećera koje će kvasci fermentirati u ugljikov dioksid i alkohol. Niže temperature unutar raspona djelovanja amilaza stvaraju više fermentabilnih šećera, dok više temperature stvaraju više nefermentabilnih šećera.

O pH vrijednosti ovisi snaga djelovanja pojedinih enzima. Ukoliko ta vrijednost nije unutar optimalnog raspona za pojedini enzim, on neće imati uvjete za djelovanje. pH vrijednost slada dovoljno je niska da spusti pH vode pri ukomljavanju.

Duljim vremenom ukomljavanja enzimi imaju više vremena za djelovanje tako da je ona potpunija. Kod dobro obrađenih sladova veći se dio pretvorbe dogodi već u prvih 30 minuta (ukoliko su drugi čimbenici povoljni, npr. temperatura, pH), tako da je za približno potpunu konverziju potrebno svega 60 minuta. Produljivanjem vremena ukomljavanja konverzija se dalje neproporcionalno povećava.[8]

2.1.2. JEČMENI SLAD

Ječam (*Hordeum vulgare*) je žitarica izgledom slična žitu, jednogodišnja biljka iz porodice trava (*Graminae/Poaceae*) (Sl.3.). Najviše se uzgaja u SAD-u i Europi. Ječam se smatra jednom od najstarijih žitarica u Europi. Sumerani su uz uobičajenu primjenu u kuhinji ječam koristili kao mjeru i novac, a Vedski tekstovi spominju ječam i rižu kao dva besmrtna nebeska sina. U Babilonu se od njega pravila kaša i pivo, a u Starom vijeku je prženi ječam bio važna živežna namirnica.[9]



Slika 3. *Ječam (Hordeum vulgare)*[10]

Postoji više vrsta ječma koji se koriste za proizvodnju različitih vrsta piva; svaka vrsta daje jedinstven, karakterističan okus i boju za određeno pivo. Ječmeni slad je zrnje slada kojemu je potaknuto klijanje do određenog stupnja, a zatim osušeno. U industriji se to postiže na način da se poveća udio vode u zrnju na 40-45% namakanjem zrnja u vodi i do 40 sati. Zrnje se tada procijedi i drži na konstantnoj temperaturi (najčešće oko 15°C) 5 dana dok ne krene klijati. Zatim se dobiveni slad suši u pećima na temperaturi koja se postepeno diže do 50°C za svjetlije i do 105°C za tamnije sladove. Sušenje u pećima traje oko 30 sati. Kasnije se odstranjuju proklijali korjenčići i zrno se drobi. [11]

2.2. AMILAZE

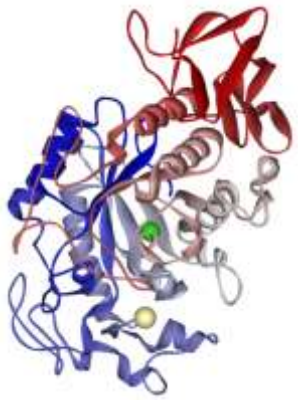
Amilaze su skupina enzima koji hidrolitički razgrađuju molekule škroba. Produkti koji pri tom nastaju niži su polimeri sastavljeni od glukoznih jedinica.[12] Danas su ti enzimi od velike važnosti u biotehnologiji, a primjena im seže od prehrambene, tekstilne, papirne, pa sve do industrije detergenata, sokova i alkoholnih pića.[13] Amilaze se mogu izolirati iz različitih izvora (biljke, životinje i mikroorganizmi), ali enzimi izolirani iz mikroorganizama najviše zadovoljavaju zahtjevima industrijske primjene. Danas je na tržištu prisutan velik broj amilaza iz mikroorganizama i gotovo su u cijelosti zamijenile kemijsku hidrolizu škroba u industriji prerade škroba.

Povijest amilaza započinje 1811. godine kada je Kirchhoff otkrio prvi enzim koji razgrađuje škrob, proučavanjem probavnih enzima i amilaze u sladu. Kasnije Ohlsson predlaže klasifikaciju enzima koji hidroliziraju slad na α− i β−amilaze, ovisno o anomernom tipu šećera koji je nastao hidrolizom. Povijest određivanja aktivnosti α-amilaze i problemi oko njezinog određivanja datiraju od 1831. kada je Leuchs započeo proučavati hidrolizu škroba pomoću sline. Moderna povijest tog enzima započela je 1833. kada su francuski kemičari Anselme Payen i Jean-Francois Persoz uspjeli izolirati amilazu iz slada, te su je nazvali dijastaza.[12]

Do danas je najviše istražena aktivnost α −amilaza, β −amilaza i γ−amilaza, dok je znatno manje podataka dostupno o drugim enzimima iz ove grupe, npr. glikozidazama, pululanazama i izoamilazama. Podjela amilolitičkih enzima u nekoliko podrazreda učinjena je prema njihovu djelovanju na pojedine komponente škroba, uvjetima aktivnosti te prema konfiguraciji anomernog ugljikovog atoma u produktu.[12]

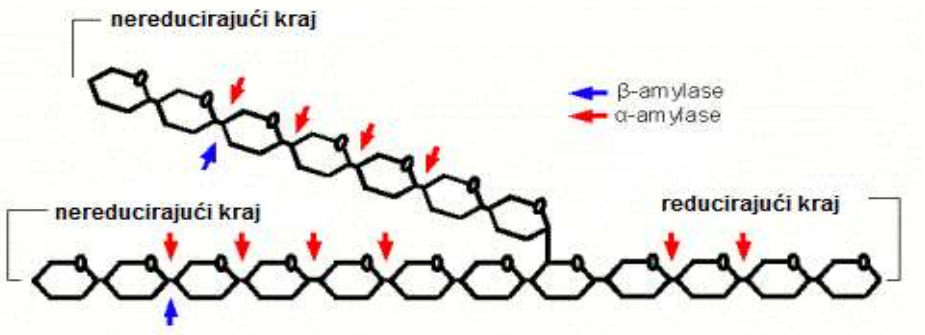
2.2.1. α−AMILAZE

Sve α−amilaze kalcijevi su metaloenzimi. U svojoj molekuli sadrže jedan do deset atoma kalcija koji su čvrsto vezani na molekulu (Sl.4.). Za enzimsku aktivnost i stabilnost konformacije, potreban je najmanje jedan kalcijev atom po molekuli. [12]



Slika 4. *Shematski prikaz strukture α−amilaze iz sline s kalcijevim ionom u aktivnom centru (zelena kuglica predstavlja kalcij)*[14]

α−Amilaza vrši konverziju škroba do reducirajućih šećera. Nasumičnim djelovanjem uzduž škrobnog lanca katalizira hidrolizu unutrašnjih α−(1, 4) glikozidnih veza (Sl.5.).[11] Djelovanje α−amilaze na amiloznu frakciju škroba odvija se u dvije faze. Najprije se odvija brza razgradnja amiloze do maltoze, maltotrioze i ostataka dužih oligosaharida. Potom slijedi sporiji stupanj koji obuhvaća razgradnju oligosaharida do glukoze i maltoze. Iz amilopektina osim maltoze i glukoze nastaju i α−ograničeni dekstrini jer enzim ne djeluje na α−(1, 6) glikozidne veze. Nasumična hidroliza omogućuje α−amilazi bržu razgradnju škroba od β−amilaze.[15]



Slika 5. *Shematski prikaz načina razgradnje škroba pomoću α− i β−amilaze*

α−Amilaza nalazi se u životinjama, biljkama, gljivama i bakterijama. Biološki uzorci kao što su slina, serum i urin također ju sadrže. U ljudskoj fiziologiji, po mjestu djelovanja spada u enzime probavnih sokova. U većim količinama amilaza se sintetizira u gušterači, a nešto manjim dijelom u žlijezdama slinovnicama.[12]

2.2.2. β−AMILAZE

Drugi oblik amilaze, β−amilazu sintetiziraju samo više biljke, gljive i bakterije (Sl.6.). Životinjska tkiva ne sadrže β−amilazu, iako može biti prisutna u mikroorganizmima unutar njihovog probavnog trakta, gdje ju koriste za razgradnju izvanstaničnog škroba.



Slika 6. *Shematski prikaz strukture β−amilaze* [16]

Djelujući od nereducirajućeg kraja škrobnog lanca, β−amilaza katalizira hidrolizu svake druge α−(1, 4) glikozidne veze, odcjepljujući dvije glukozne jedinice u isto vrijeme, pa se kao krajnji proizvod djelovanja ovog enzima javlja β−maltoza (Sl.5.). Tijekom zrenja voća β−amilaza razgrađuje škrob u maltozu zbog čega je zrelo voće slatkog okusa. U sjemenkama je također prisutna, zajedno s α−amilazama i proteazama. β−Amilaza je prije klijanja prisutna u neaktivnom obliku. Optimalna pH vrijednost djelovanja ovisi o izvoru enzima. Kod biljnih vrsta to je područje niže i iznosi pH 5−6. [12]

2.3. ODREĐIVANJE AMILAZA

Za određivanje amilazne aktivnosti do 1980. godine razvijeno je oko 200 metoda. Ono što ih međusobno povezuje i razlikuje principi su na kojima se zasnivaju i supstrati koje koriste. Sve metode mogu se razvrstati na dvije kategorije: spektrofotometrijske i elektroanalitičke metode. Uz njih često se koriste i viskozimetrijska, nefelometrijska i metoda bazirana na promjeni mase supstrata. [13]

Viskozimetrijska metoda zasniva se na mjerenju smanjenja viskoznosti otopine škroba uslijed hidrolize dijastazom. Nefelometrijska metoda temelji se na smanjenju rasipanja svijetla supstrata amilopektina uslijed hidrolize. Metoda zasnovana na promjeni mase supstrata se bazira na direktnom određivanju ostataka škroba kvantitativnim taloženjem u etanolu, pri čemu talog ne sadrži dekstrin i maltozu. Razlika u masi prije i nakon hidrolize proporcionalna je aktivnosti α-amilaze.[11]

Za određivanje katalitičke aktivnosti α-amilaze koriste se još i elektroforeza, izoelektrično fokusiranje, kromatografija te imunološke metode.[13]

Razlog postojanja velikog broja metoda leži u dvije činjenice. Prva je velika važnost i zastupljenost određivanja α-amilaze u dijagnostici i kvaliteti hrane. Druga je činjenica potreba za razvojem i usavršavanjem već postojećih metoda. Iz potrebe da se aktivnost odredi objektivno i selektivno svaka je sljedeća metoda nastojala otkloniti nedostatke i ograničenja prethodne. Svrha je uvijek dobivanje što boljih rezultata, ali i ekonomska isplativost. Na osnovi nekoliko temeljnih principa razvijene su mnogobrojne metode, modifikacije istih, njihove adaptacije i međusobne kombinacije, te na kraju i njihova automatizacija i minijaturizacija.

Sve dostupne metode zasnivaju se na biokatalitičkom određivanju amilaze, a ono na smanjenju intenziteta boje kompleksa trijodid-škrob, porastu koncentracije reducirajućih šećera, degradaciji supstrata koji ima kovalentno vezanu boju ili u smanjenju viskoznosti suspenzije škroba.[13]

2.3.1. SPEKTROFOTOMETRIJSKE METODE

U spektrofotometrijskim metodama dva su najzastupljenija postupka određivanja amilazne aktivnosti: amiloklasični i saharogenski postupak.

Amiloklasični se postupak zasniva na smanjenju intenziteta boje kompleksa trijodid-škrob. Škrob s trijodidom formira kompleks izrazito plave boje koja se progresivnom hidrolizom škroba mijenja preko crveno-smeđe do narančasto-žute. Metodom se određuje dekstrinizirajuća aktivnost amilaze smanjenjem intenziteta plave boje. Ovo svojstvo temelj je niza metoda koje su razvijane usavršavanjem polaznog postupka.[11]

S druge strane, saharogenski postupak zasniva se na porastu količine reducirajućih šećera koji nastaju amilolitičkom razgradnjom škroba. Njihova se količina može izmjeriti korištenjem nekog oksidansa. Glavni je nedostatak metode spori nestanak boje i razaranje glukoze pomoću DNSA reagensa (3,5-dinitrosalicilne kiseline). Metoda koristi dva svojstva dinitrosalicilne kiseline: prvo da reagira sa reducirajućim šećerima nastalim hidrolizom škroba pod utjecajem amilaza, te drugo da daje obojeni produkt koji apsorbira svjetlost valnih duljina na 540 nm. Ova je metoda doživjela razne modifikacije kojima se nastojala poboljšati njena preciznost, pojednostaviti način i skratiti vrijeme izvođenja, smanjiti količinu reagensa, te otkloniti postojeća ograničenja.[12]

Još jedna u nizu optičkih metoda je razgradnja supstrata s vezanom bojom. Zasniva se na uporabi novih supstrata kao što su boje Remazol brilliant Blue R ili Cibacron Blue F3 G-A koje se kovalentno vežu na škrob, te nitrofenilnih derivata maltosaharida. Jednostavne su, pouzdane i brze, ali skupocjene jer uključuje uporabu sintetičkih supstrata i specifičnih enzima. Zbog toga su ograničene samo na posebne testove.[17]

2.3.2. ELEKTROANALITIČKE METODE

Elektroanalitičke metode za određivanje aktivnosti α-amilaze svode se na određivanje produkata nastalih razgradnjom škroba ili njegovih derivata do manjih polisaharida ili oligosaharida i glukoze. To su zapravo glukozni senzori koji mjere koncentraciju nastale glukoze koja je u korelaciji s aktivnošću α-amilaze. Elektrokemijska mjerenja imaju prednost pred ostalima jer su nezavisna od utjecaja zamućenosti i obojanosti otopine.[13]

Drugu vrstu čine senzori koji kao supstrat koriste derivatizirani oligosaharid koji nakon amilolitičke hidrolize daje elektroaktivnu komponentu. Elektroda se podesi na potencijal pri kojem derivatizirani oligosaharid nije elektroaktivan. Na taj se način može odrediti promjena struje zbog elektrokemijske aktivnosti elektroaktivne komponente i ona je u korelaciji s aktivnošću α-amilaze. Ove metode obuhvaćaju niz amperometrijskih metoda i voltametrijskih metoda. U sklopu njih razvijeni su razni biosenzori te jednokratni biosenzori za brzo, jednostavno i osjetljivo određivanje aktivnosti α-amilaze.[13]

2.3.3. ODREĐIVANJE AMILAZA U SLADU

Za određivanje amilaza u sladu razvijene su tijekom vremena različite metode. Većina njih bazira se na određivanju α-amilaze jer je ona u sladu dominantna. Ovim metodama zajedničko je da se temelje na mjerenju promjene boje koja nastaje interakcijom joda i β-limitiranih dekstrina u škrobu.[11]

Udio α-amilaze u sladu dosta je visok te su zato razvijene primjenjivije metode za njeno određivanje, poput škroba označenog s bojama i slične Ceralpha metode.[18] Za istraživanja s velikim brojem uzoraka često se koristi i Phadebas [19] metoda zbog jednostavnosti izvedbe. U proizvodnji piva najčešće se koriste dvije standardne metode, *AOAC Official Method 955.22* i *EBC Method 4.13*.

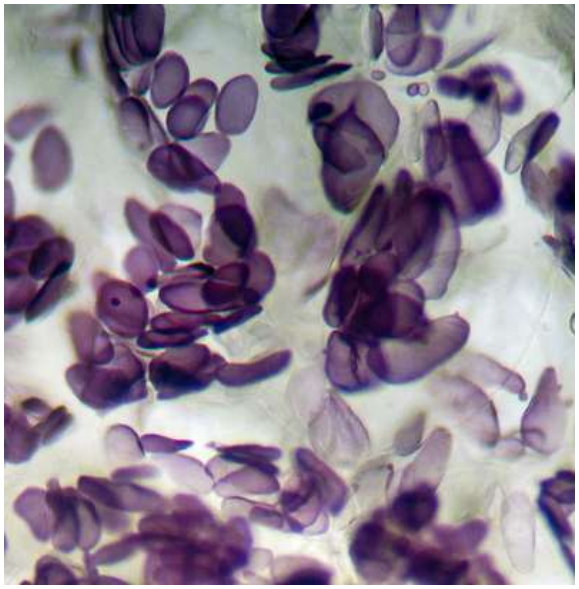
AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*) metoda za određivanje α-amilaze u sladu temelji se na uspoređivanju boje smjese u epruveti nakon desetominutne hidrolize škroba, s bojom diska α-amilaze u komparatoru (npr. standardnom Hellige komparatoru). Ova je metoda dugotrajna (preporučeno je da vrijeme hidrolize bude između

10 i 30 minuta, što podrazumijeva i prethodnu optimizaciju), zahtjeva specifične reagense (poseban škrob i čistu β-amilazu, koja se koristi u pripremi substrata kako bi razgradila škrob do β-limitiranih dekstrina što automatski isključuje grešku u mjerenju jer nema dodatne aktivnosti β-amilaze iz slada) i aparaturu.

EBC (*European Brewery Convention*) metoda istovjetna je s AOAC metodom, uz korištenje drugačijih specifičnih reagenasa. Obje metode imaju nekoliko nedostataka. Prvi nedostatak je nemogućnost dovoljno dobre standardizacije preporučenog škroba. Drugi nedostatak je predugo vrijeme djelovanja β-amilaze u pripremi supstrata, koje može biti između 18 i 72 sata. Također, pH vrijednost pufera podešava se na 4,7 što nije optimalna vrijednost za djelovanje α-amilaze (tijekom ukomljavanja vrijednost pH kreće se oko 5,5-5,9). [11]

2.4. ŠKROB

Škrob je ugljikohidrat opće formule $(C_5H_{10}O_5)n$, biopolimer izgrađen od velikog broja molekula α-D-glukoze koje su međusobno povezane α-glikozidnim vezama. Proizvode ga sve zelene biljke u kojima služi kao skladište energije (glukoze), a pohranjen je u plastidima, najčešće kloroplastima i amiloplastima. Kao i celuloza, produkt je asimilacije u biljkama te se nagomilava u korijenu, gomoljima, sjemenkama i stabljici. Asimilacijski ili primarni škrob nastaje u fotosintetskom tkivu biljaka tijekom osvjetljavanja. Primarni proizvod fotosinteze je glukoza, ali ona se kondenzira u netopljivi škrob da se ne poveća osmotski tlak u stanici. Preko noći škrob se postepeno razgrađuje i transportira u druga tkiva te se tamo izgrađuju zrnca rezervnog škroba (Sl.7.). Analog škroba u životinjskom svijetu je glikogen.[20]



Slika 7. *Zrnca škroba unutar stanica banane, obojana jodom* [21]

Škrob je količinski najzastupljeniji ugljikohidrat u prehrani čovjeka i domaćih životinja. Najviše ga se može naći u krumpiru, pšenici, kukuruzu, riži i nekim vrstama žitarica. Škrob nalazi brojne primjene u prehrambenoj industriji, a koristi se i u proizvodnji papira i ljepila, te u tekstilnoj industriji.

Čisti škrob je bijeli ili blijedožuti prah u obliku sitnih zrnaca, bez okusa i mirisa na brašno. Netopljiv je u hladnoj vodi, alkoholu i eteru, dok se u vrućoj vodi otapa do određene granice kada dolazi do nastajanja guste koloidne otopine koja hlađenjem prelazi

u čvrsti gel. Molekule škroba imaju mnogo hidroksilnih skupina pa se mogu međusobno povezivati vodikovim mostovima, pri čemu nastaje škrobno zrno.[20]

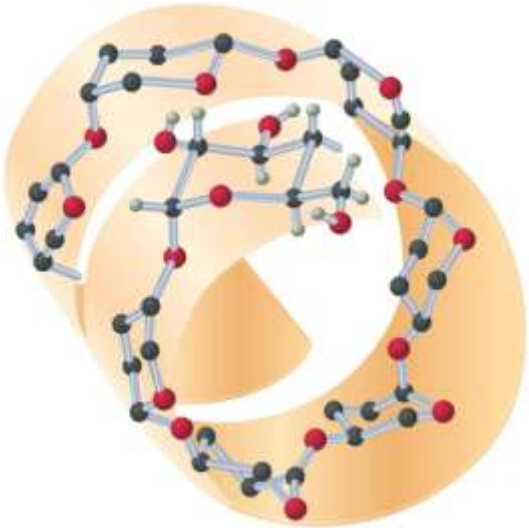
Škrob je zbog svog sastava podložan hidrolizi. Kod hidrolize škroba kidaju se veze između pojedinih glukozidnih jedinica uz primanje vode. Može se provesti uz pomoć anorganskih kiselina ili enzimima. Ako je hidroliza djelomična nastati će mnoštvo produkata u obliku monosaharida, disaharida i oligosaharida kao što su glukoza, maltoza, maltotrioza i dekstrini. Potpunom hidrolizom škroba dobiva se samo glukoza.[22]

Raznim istraživanjima pokazalo se da škrob nije jedinstvena molekula. Ovisno o načinu povezivanja glukoznih jedinica, škrob se dijeli na dvije osnovne komponente, amilozu i amilopektin. Njihov omjer ovisi o porijeklu škroba. Razdvajanje ovih komponenata obično se izvodi tako što se vrućoj vodenoj otopini škroba doda butanol, timol, nitrobenzen ili neko drugo sredstvo za taloženje, pri čemu se amiloza izdvaja u obliku netopljivog kompleksa koji se razara pomoću etanola.[20]

2.4.1. AMILOZA

Amiloza je nerazgranata komponenta škroba u kojoj su molekule α-D-glukoze povezane α-1,4-glikozidnom vezom. Stupanj polimerizacije amiloze kreće se od 500 do 1500, ovisno o porijeklu. [12]

Međusobno povezane glukozne jedinice ne grade izduženu formaciju, već spiralno uvijeni lanac u obliku nepravilne lijeve uzvojnice (Sl.8.). Postoje tri glavna oblika amiloznih lanaca. Lanci mogu postojati u neuređenoj amorfnoj konformaciji ili u dva različita oblika uzvojnica. Mogu se međusobno povezati u dvostruku uzvojnicu (A ili B oblik) ili se vezati s drugom hidrofobnom gost-molekulom kao što su jod, masne kiseline ili aromatski spojevi. Takav oblik poznat je kao V oblik i na taj se način i amilopektin veže na amilozu pri izgradnji škroba. Unutar ovog oblika postoji nekoliko varijacija, pri čemu se svaka označava s V i subskriptom koji pokazuje broj glukoznih jedinica po okretu. Najčešći je V6 oblik, sa 6 glukoznih jedinica po okretu.[23] Hidrolizom amiloze dobije se D (+) – maltoza kao jedini disaharid i D (+) – glukoza kao jedini monosaharid.

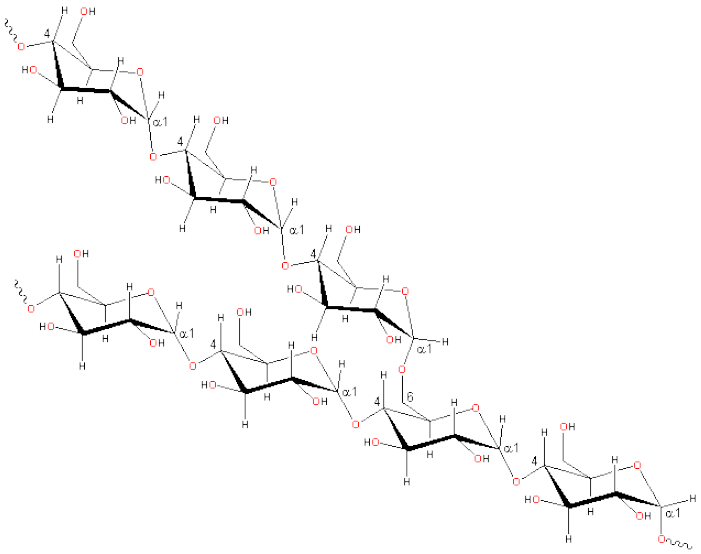


Slika 8. *Struktura nepravilne lijeve uzvojnice amiloze* [24]

Amiloza može imati i bočne lance čiji broj i stupanj polimerizacije raste s molekulskom masom amiloze. Otprilike četvrtina mase škrobnog zrnca otpada na amilozu iako molekula amiloze ima i do sto puta više od molekula amilopektina.[20]

2.4.2. AMILOPEKTIN

Amilopektin je razgranata komponenta škroba. U njemu su molekule α-D-glukoze povezane α-1,4-glikozidnom vezom u lance, ali i α-1,6-glikozidnom vezom na mjestima grananja. Mjesta grananja nisu nasumična nego ih određuju posebni enzimi i ona se ponavljaju svakih 24 do 30 glukoznih jedinica. Na tim mjestima stvaraju se bočni ogranci kojih može biti i do 100 po jednoj molekuli, a svaki se sastoji od 20 do 25 glukoznih jedinica.[23] Broj glukoznih jedinica po grani ovisi o vrsti, zrelosti i lokaciji škroba. U molekuli amilopektina tako može biti vezano do milijun jedinica glukoze, što ga čini jednom od najvećih molekula u prirodi.



Slika 9. *Struktura amilopektina* [25]

Zbog svoje razgranate strukture amilopektin ne može formirati stabilne komplekse s jodom, odnosno zbog kratkih bočnih lanaca veže samo manju količinu joda, pa u reakciji s jodom daje boju slabijeg intenziteta (crveno smeđu boju). Djelovanjem α-amilaze na amilopektin dolazi do djelomične hidrolize pri čemu nastaju maltoza i granični dekstrini.[20]

2.5. TRIJODIDNI ION

Reakcijom jodidnog aniona s jednom ili više molekula joda nastaje odgovarajući polijodidni anion. Najjednostavniji polijodidni anion je trijodidni anion, I_3^-. Osim njega postoje pentajodidni anion, I_5^-, heptajodidni anion, I_7^-, a također i anioni s dva negativna naboja, primjerice I_4^{2-}. [26]

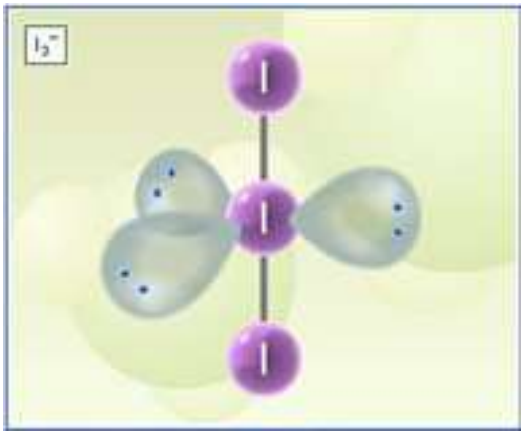
Jod se slabo otapa u vodi. Bolje otapanje postiže se dodatkom kalijevog jodida. U vodi kalijev jodid disocira na kalijeve i jodidne ione, prema jednadžbi (1):

$$KI_{(s)} \overset{H_2O}{\longleftrightarrow} K^+_{aq} + I^-_{aq} \qquad (1)$$

Jodidni ion, I^-, reagira sa slobodnim jodom, I_2, stvarajući trijodidni ion, I_3^-, koji je topljiv u vodi i reagira sa škrobom. Reakcija joda i jodidnog iona prikazana je jednadžbom (2):

$$I^- + I_2 \leftrightarrow I_3^- \qquad (2)$$

Trijodidni ion ne podliježe pravilu okteta. VSEPR teorija predviđa linearan oblik. Njegova struktura tumači se veličinom atoma joda i malenim energijskim razlikama između p− i d− orbitala O−ljuske, tako jod može u zadnjem energijskom nivou imati više valentnih elektrona. To se objašnjava dsp^3 hibridizacijom centralnog atoma joda, kojega okružuju tri nepodijeljena elektronska para u ekvatorijalnoj ravnini trigonske bipiramide, a preostali atomi nalaze se na aksijalnim položajima (Sl.10.). [26]



Slika 10. *Linearna struktura trijodidnog aniona* [27]

2.5.1. NASTAJANJE KOMPLEKSA ŠKROB-TRIJODID

Reakciju između joda i škroba otkrili su 1841. godine Colin i Claubry. Uslijedili su mnogobrojni pokušaji objašnjenja prirode kromatofora koji apsorbira na 620 nm ostvarujući karakteristično "jodno plavo" − duboko plavo obojenje.

Analiza amiloze rentgenskim zrakama pokazala je spiralno spletene lance škroba u obliku uzvojnice, čija unutrašnjost ostavlja dovoljno prostora za smještaj trijodidnog iona, pri čemu nastaje kompleks amiloza-trijodid odgovoran za plavu boju kompleksa škrob-trijodid. Često se iz topljivog škroba, koji se upotrebljava kao indikator, odstranjuje amilopektin te on sadrži uglavnom amilozu. Razlog tomu je reakcija amilopektina s jodom koja stvara crveno obojenje. Reakcija nije dovoljno reverzibilna te je zbog toga nepoželjna. [28]

Jednadžba (3) prikazuje kemijsku reakciju i stvaranje kompleksa škrob-trijodid nakon dodatka škroba u otopinu kalijevog trijodida:

$$[KI_3]_0 + [KI]_0 + škrob \rightleftharpoons [škrob - KI_3] + [KI_3]_1 + [KI]_0 \qquad (3)$$

gdje je $[KI_3]_0$ = početna koncentracija kalijevog trijodida,

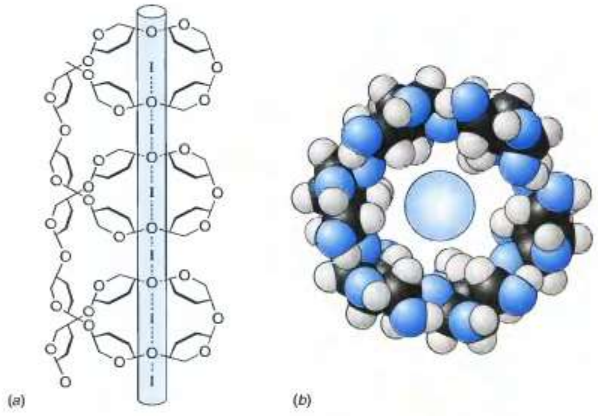
$[KI]_0$ = početna koncentracija kalijevog jodida,

$[škrob - KI_3]$= koncentracija kompleksa škrob-trijodid,

$[KI_3]_1$ = koncentracija nevezanog kalijevog trijodida.

U kompleksu škroba, amiloza tvori spiralnu strukturu s razmakom od 8,0 Å, vanjskim promjerom od 13,0 Å i središnjom šupljnom širine 5,0 Å te sa 6 glukoznih jedinica po okretu. Šupljina ostavlja dovoljno prostora za smještaj atoma joda. Oni se linearno poredaju u polijodidni lanac s prosječnim razmakom atoma od 3,1 Å, karakterističnom udaljenošću koja je uočljiva i kod drugih jodnih kompleksa koji su intenzivno obojeni zbog prisutnosti polijodidnih lanaca. Kasnije provedena detaljnija istraživanja s rentgenskim zrakama i modelnim izračunima ukazivala su da je zavojnica koju stvara amilozni kompleks s jodom lijevog smjera, stabilizirana međuglukoznim vodikovim vezama. Daljnja istraživanja dala su podatke koji su interpretirani na sljedeći način: unutrašnju šupljinu kompleksa amiloze i joda ispunjava linearni lanac jednako

udaljenih atoma joda (I_2) i velikih asocijata trijodida (I_3^-), pentajodida (I_5^-) i viših jodida ili smjesa tih vrsta prema modelnoj ravnoteži.[28]



Slika 11. *(a) Shema strukture amiloza-trijodid kompleksa; (b) pogled od gore na strukturu kompleksa (jod vidljiv u sredini uzvojnice)* [29]

2.5.2. ŠKROB - INDIKATOR ZA JOD

Zbog sposobnosti stvaranja obojenog kompleksa s trijodidnim ionom škrob je našao primjenu kao indikator, specifičan za redoks-reakcije u kojima je jod oksidans ili reducens. Međutim, otopina škroba koja sadrži malu količinu trijodidnog ili jodidnog iona može djelovati i kao pravi redoks-indikator. U prisutnosti suviška oksidirajućeg reagensa omjer joda i jodida je visok, što otopini daje plavu boju. U suvišku reducirajućeg reagensa prevladava jodidni ion, te izostaje plavo obojenje. Zbog toga indikatorski sustav mijenja boju tijekom titracije mnogih reducirajućih reagenasa s različitim oksidirajućim reagensima od bezbojnog u plavo. Promjena boje prilično je neovisna o kemijskom sastavu reaktanata, a ovisi samo o potencijalu sustava u točki ekvivalencije. [30]

Škrob je vrlo osjetljiv indikator; u idealnim uvjetima pokazuje prisutnost joda i u koncentracijama manjim od $2x10^{-7}$ M. Boja kompleksa koja nastaje dodatkom otopine joda (trijodida) ovisi o duljini nerazgranatog polisaharida. Rezultati su ukazivali da svaka glukozna jedinica dodatno doprinosi jačem efektu konačne boje. Tako lanci dugi četiri do šest glukoznih jedinica ne stvaraju komplekse s trijodidom, odnosno ne pojavljuje se obojenje. Lanci dugi 8-12 jednica daju crvenkasto obojenje, a oni od 30-35 jedinica plavo.[20]

2.6. POTENCIOMETRIJA

Potenciometrija je elektroanalitička metoda koja se temelji na mjerenju razlika potencijala između elektroda elektrokemijskog članka uz ravnotežne uvjete - napon članka mjeri se tako da kroz članak ne teče struja odnosno teče tako mala struja da ona ne utječe na mjerljivo stanje ravnoteže na elektrodama. Teorijsku osnovu ove metode čini Nernstova jednadžba koja povezuje elektrodni potencijal i koncentraciju mjerenog iona u otopini. [31]

Potenciometrijska se mjerenja uvijek odvijaju u sustavu s dvije elektrode: mjerne elektrode, odnosno indikatorske elektrode i referentne elektrode. Obje elektrode tvore polučlanke koje stavljene zajedno u neku otopinu daju razliku potencijala. Pretvorbe vezane za određivanje potencijala uvijek se javljaju na kontaktima faza, npr. između otopine i površine elektrode.[30]

Idealna referentna elektroda ima potencijal koji je poznat, stalan i potpuno neovisan o sastavu otopine analita.[31] Zbog praktičnosti standardna vodikova elektroda često se zamjenjuje mnogo pogodnijim sekundarnim referentnim elektrodama. Potencijali sekundarnih elektroda pomno su određeni u odnosu na standardnu vodikovu elektrodu kako bi se mogli prevesti u potencijal standardne vodikove elektrode. Neki od primjera referentnih elektroda su kalomelova i srebro/srebrov klorid elektroda.

Idealna indikatorska elektroda daje brz i reproducibilan odziv na promjene koncentracije iona (ili skupine iona) analita. Iako ne postoji indikatorska elektroda koja je potpuno selektivna, na tržištu je dostupno nekoliko selektivnih elektroda. Postoje dvije vrste indikatorskih elektroda: metalne i membranske.

Metalne indikatorske elektrode uglavnom se razvrstavaju kao:

a) elektrode prvog reda,

b) elektrode drugog reda

c) inertne redoks-elektrode.

Kao inertne redoks elektrode koriste se inertni metali poput zlata, platine, paladija, ali i nemetal ugljik, na kojima se uspostavlja redoks potencijal nakon uranjanja u otopinu u kojoj je određena ionska vrsta prisutna u dva oksidacijska stanja. Površina elektrode je

inertna na redoks reakciju. Metalni ioni se ne otpuštaju s površine metala pa metalna površina elektrode koristi samo kao katalizator, tj. nosač elektrona drugog redoks para. Njihov standardni elektrodni potencijal je jako pozitivan, uronjene u otopinu poprimaju potencijal koji ovisi samo o svojstvima redoks sustava u otopini.[31]

Ovisnost elektrodnog potencijala redoks sustava o aktivitetu oksidiranog i reduciranog oblika u otopini daje Nernstova jednadžba za elektrodni potencijal:

$$E = E^{\circ} + \frac{RT}{zF} \ln \frac{a_{ox}}{a_{red}} = E^{\circ} + \frac{2.303RT}{zF} \log \frac{a_{ox}}{a_{red}}, \qquad (4)$$

gdje je *E* izmjereni potencijal redoks sustava,

E° standardni elektrodni potencijal redoks sustava,

R univerzalna plinska konstanta,

T termodinamička temperatura,

z broj elektrona koji se izmjenjuju u redoks reakciji,

F Faradayeva konstanta,

a_{ox} aktivitet oksidirane vrste,

a_{red} aktivitet reducirane vrste.

Većina redoks reakcija uključuje protone, stoga izmjereni potencijal ovisi o pH vrijednosti. U slučaju da se reakcija s protonima ne može isključiti, bitno je da se pH odredi ili prilagodi na određenu vrijednost.

Signal pobude u potenciometriji je kemijska reakcija, a signal odziva razlika potencijala (elektrokemijski potencijal). U svakom polučlanku, na sučelju elektroda-elektrolit, dolazi do spontane redoks reakcije. Tendencija pojedine elektrode da se oksidira ili reducira u nekom elektrolitu definirana je elektrokemijskim potencijalom. U ovisnosti o razlici elektrokemijskih potencijala dvije elektrode, jedna elektroda (anoda) će se oksidirati, dok će se druga elektroda (katoda) reducirati. Dakle, članak ostvaruje razliku

potencijala (električni napon), čija vrijednost ovisi o kemijskim procesima koji se odvijaju na obje elektrode. Tu razliku moguće je mjeriti voltmetrom. [31]

Napon elektrokemijskog članka se također naziva elektromotorna sila ili EMS *(eng. EMF)* članka, a dan je izrazom:

$$E_{članka} = E_{ind} - E_{ref} + E_{pren}, \tag{5}$$

gdje je $E_{članka}$ potencijal elektrokemijskog članka (elektromotorna sila),

E_{ind} potencijal indikatorske elektrode,

E_{ref}potencijal referentne elektrode,

E_{pren}prenapon (*eng.liquid junction*).

Prenapon nastaje na granici između dva elektrolita. Javlja se na kontaktu referentne elektrode i otopine u članku. Ukupna razlika potencijala koja se uspostavlja između indikatorske i referentne elektrode predstavlja sumu lokalnih razlika potencijala, koji se uspostavljaju na svakoj elektrificiranoj faznoj granici. Potencijal indikatorske elektrode odgovor je na promjenu aktiviteta specije koja se određuje, mjeri se u sklopu s odabranom pogodnom referentnom elektrodom, i dan je izrazom:

$$E = E^\circ + \frac{RT}{zF} \ln a_M = E^\circ + \frac{2.303RT}{zF} \log a_M, \tag{6}$$

Izraz ispred logaritma u izrazu naziva se nagib.

$$S = \frac{2.303RT}{zF}, \tag{7}$$

Pri standardnoj temperaturi (T=298 K) i z =+1 njegova je vrijednost 0,059 V. Nagib S, kao faktor u Nernstovom izrazu, predstavlja teorijski nagib elektrode, a odgovara promjeni potencijala uzrokovanoj porastom aktiviteta a_M za faktor 10. Nernstov je izraz

direktno ovisan o temperaturi. Zbog toga je bitno uzeti temperaturu u izračune prilikom mjerenja u direktnoj potenciometriji.[30]

Nernstova jednadžba povezuje svojstva elektrolita s potencijalom koji nastaje u članku. Potrebno je uzeti u obzir da Nernstov matematički model prvenstveno govori o utjecaju koncentracije reaktanta na elektrokemijski potencijal članka. No u gornjem izrazu je utjecaj na elektrokemijski potencijal članka definiran preko ionskih aktiviteta koji se mogu aproksimirati iz koncentracija. Aktivitet iona koji se određuje, a_M, a koji se nalazi i u Nernstovoj jednadžbi povezan je s analitičkom koncentracijom preko koeficijenta aktiviteta γ:

$$a_M = \gamma c_M \tag{8}$$

Za jako razrijeđene otopine čija je koncentracija $c_M \leq 0{,}001\ mol/L$ koeficijent aktiviteta γ teži prema 1, a aktivitet iona proporcionalan je koncentraciji.[31]

Prema Debye-Hückelov-om zakonu, posljedica je to ionske atmosfere suprotnog neto naboja kojom je svaki ion okružen, te on više nije efektivan kao slobodan. Interakcija centralnog iona s njegovom atmosferom utječe na svojstva otopine elektrolita. Ovo utječe i na reaktivnost i na iznos potencijala indikatorske elektrode. [30]

Uz konstantnu temperaturu i određeno otapalo, svojstva elektrolita ovise samo o *z* i *c*:

$$I = \frac{1}{2}\sum c_i z_i^2, \tag{9}$$

pri čemu je *I* ionska jakost otopine, mjera za električno okruženje iona u otopini.

Ako se ionska jakost otopine održava konstantnom, aktivitet iona ovisit će samo o njihovoj koncentraciji. Dakle, ako su ova tri uvjeta ispunjena, potencijal elektrode ovisit će samo o koncentraciji iona kojega se određuje. Konstantna ionska jakost postiže se dodatkom, u velikom suvišku, elektrolita čiji ioni ne sudjeluju u promatranoj ravnoteži, tako da se ionska jakost ne mijenja bitno promjenom koncentracije ispitivanih iona.[30]

2.6.1. DIREKTNA POTENCIOMETRIJA

Direktna potenciometrijska mjerenja brz su i pogodan način za određivanje aktiviteta kationa i aniona. Postupak je jednostavan za izvođenje: priredi se serija otopina različitih koncentracija ispitivanog iona: a_1, a_2, a_3, ….. a_n, i tim otopinama se izmjere vrijednosti za potencijal E: E_1, E_2, E_3, ….. E_n, prema kojima se konstruira baždarni dijagram E = f(log a), pri čemu se za određivanje aktiviteta koristi linearni dio dijagrama. [30]

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. REAGENSI I INSTRUMENTACIJA

Prilikom izvođenja eksperimentalnog dijela rada korištene su sljedeće kemikalije:

- kalijev jodid, p.a. (Sigma –Aldrich)
- jod, p.a. (Kemika)
- natrijev acetat trihidrat, p.a. (Kemika)
- octena kiselina, glacijalna (Panreac)
- topljivi škrob, p.a. (Kemika)
- natrijev klorid (Sigma-Aldrich)
- kalcijev klorid (Kemika)
- klorovodična kiselina (Carlo Erba)
- natrijev hidroksid (Kemika)
- različiti uzorci ječmenog slada
- deionizirana voda

Za izvođenje potenciometrijskih mjerenja korišten je Metrohm 780 pH metar (Metrohm, Švicarska) i kombinirana platinska redoks-elektroda IJ64 (Ionode, Australija). Za inkubaciju slada i α-amilaze korišten je termostat (PolyScience Thermostat, SAD). Za obradu podataka korišten je program Excel u sustavu Microsoft Office.

Za snimanje spektara za Phadebas test u UV-VIS području korišten je AVANTES (AvaSpec-2048-2, Nizozemska) spektrofotometar u području od 190 do 1000 nm. Svi spektri snimljeni su uz upotrebu staklenih kiveta širine 1 cm. Program AVASoft software (Avantes) korišten je za prikupljanje i obradu dobivenih podataka.

3.2. PRIPREMA OTOPINA

Priprema otopine za kondicioniranje (CS, conditioning solution)

Otopina za kondicioniranje pripremljena je dodavanjem 0,1 mol kalcijeva klorida i 20 mmol natrijevog klorida otopini acetatnog pufera (0,1 M, pH=6). Tako priređena otopina korištena je za pripremu otopina ekstrakata slada i amilaza.

Priprema ekstrakta slada

Ekstrakti slada priređeni su miješanjem 20 g fino mljevenog slada sa 100 mL otopine za kondicioniranje. Smjesa je inkubirana sat vremena na 30°C uz povremeno miješanje, a zatim filtrirana kroz naborani filtrirni papir. Dobiveni ekstrakt čuva se u hladnjaku. Za pripremu otopine ekstrakta 1 mL ekstrakta slada dodaje se u 24 mL otopine CS-a, čime se dobije 4%-tna otopina ekstrakta slada.

Priprema ekstrakta α-amilaze iz slada

Ekstrakti α-amilaze iz slada priređeni su miješanjem fino mljevenog slada s otopinom koja sadrži 2 g/L kalcijevog klorida, u omjeru 1 g slada na 5 mL otopine. Smjesa je ostavljena sat vremena na 30°C uz povremeno miješanje. Nakon sat vremena pH otopine prilagođen je na 6 pomoću 0,5 M otopine natrijevog hidroksida. Tako priređenoj smjesi u vodenoj kupelji temperatura se podiže polako na 70°C i zatim drži na toj temperaturi 15 minuta. Nakon toga smjesa se ohladi pod mlazom vode i filtrira preko naboranog filtrirnog papira.[32] Tako dobiveni ekstrakt čuva se u zamrzivaču. Za pripremu otopine ekstrakta α-amilaze 1 mL ekstrakta dodaje se u 24 mL otopine CS-a, čime se dobije 4%-tna otopina ekstrakta α-amilaze.

Priprema ekstrakta β-amilaze iz slada

Ekstrakti β-amilaze iz slada priređeni su miješanjem fino mljevenog slada s 5%-tnom otopinom natrijevog klorida u omjeru 1 g slada na 5 mL otopine. Smjesa je ostavljena preko noći (idealno 3-18 sati) na 30°C uz povremeno miješanje prvih sat vremena. Nakon ekstrakcije smjesi je snižen pH na 3 pomoću 0,5 M otopine klorovodične kiseline te je smjesa ostavljena stajati još 2 sata na temperaturi od 30°C. Posljednji korak je podizanje pH smjese na 4,5-5 pomoću 0,5 M otopine natrijevog hidroksida i filtracija preko naboranog filtrirnog papira.[32] Tako dobiveni ekstrakt čuva se u zamrzivaču. Za

pripremu otopine ekstrakta β-amilaze 1 mL ekstrakta dodaje se u 24 mL otopine CS-a, čime se dobije 4%-tna otopina ekstrakta β-amilaze.

Priprema inhibicijske otopine trijodida s octenom kiselinom (ATIS, acetic acid-triiodide inhibition solution)

Otopina kalijevog trijodida pripremljena je otapanjem krutog joda (c=100 μM) u malom volumenu otopine kalijevog jodida, (c=0,05 M). Kristaliće joda potrebno je otopiti u malom volumenu koncentrirane otopine kalijeva jodida uz snažno miješanje. Kada se sav jod otopi, otopini se doda ledena octena kiselina te se tikvica nadopuni deioniziranom vodom do konačne koncentracije kiseline od 1M. Otopina trijodida s octenom kiselinom koristi se za inhibiciju aktivnosti α-amilaze i indikatorsku reakciju trijodida s nehidroliziranim škrobom. Pripremljena otopina čuva se na hladnom i tamnom mjestu jer nije osobito stabilna zbog osjetljivosti joda na svjetlost. Također ju ne treba ni dugo držati otvorenu jer će jod polako ishlapiti na zraku.

Priprema otopine škroba 5 g/L

Za pripremu 100 mL otopine potrebno je izvagati 0,500 g škroba. Izvagani škrob prebaci se u odmjernu tikvicu od 100 mL i dopuni do oznake acetatnim puferom (0,1M, pH=6). Otopina se zagrijava uz stalno miješanje dok se sav škrob ne otopi. Otopina se zatim ohladi pod mlazom vode na sobnu temperaturu. Otopinu škroba treba uvijek pripravljati svježu jer se razgrađuje kroz nekoliko dana što utječe na njenu koncentraciju i svojstva.

3.3. POSTUPAK

Potenciometrijska mjerenja u radu izvedena su na dva načina:

1) Ovisnost elektrodnog potencijala sustava u ovisnosti o volumenu (koncentraciji) slada/amilaze

U epruvete se doda 2 mL otopine škroba i različiti volumeni CS-a u rasponu od 2,5 – 0 mL. Epruvete se inkubiraju na 40°C 10 minuta,[13] a zatim se svakih 30 sekundi u pojedinu epruvetu dodaje odgovarajući volumen otopine ekstrakta slada/amilaze. Nakon 10 minuta u epruvete se doda 5 mL otopine ATIS. Detaljan raspored inkremenata i vremenskih intervala nalazi se u Tablici 1. Kada se temperatura sadržaja u epruvetama spusti na sobnu temperaturu mjeri se potencijal sustava. Za svaki uzorak slada i pripadajuće amilaze mjerenje se ponavlja 5 puta. Mjerenja su napravljena i za otopine ekstrakta slada/amilaze koji su prethodno inkubirani na 70°C 15 minuta.

Tablica 1.*Shema pripreme uzoraka i tijeka mjerenja za ovisnost elektrodnog potencijala o volumenu slada/amilaze*

Oznaka uzorka	V(škrob) / mL	V(CS) / mL	V(slad/amilaza) /mL	t(dodatak slada/amilaze) / min	V(ATIS) / mL	t(dodatak ATIS-a) / min
0	2,00	2,50	0,00	0	5,00	10
1	2,00	2,25	0,25	0,5	5,00	10,5
2	2,00	2,00	0,50	1	5,00	11
3	2,00	1,75	0,75	1,5	5,00	11,5
4	2,00	1,50	1,00	2	5,00	12
5	2,00	1,25	1,25	2,5	5,00	12,5
6	2,00	1,00	1,50	3	5,00	13
7	2,00	0,75	1,75	3,5	5,00	13,5
8	2,00	0,50	2,00	4	5,00	14
9	2,00	0,25	2,25	4,5	5,00	14,5
10	2,00	0,00	2,50	5	5,00	15

2) Ovisnost elektrodnog potencijala sustava u ovisnosti o vremenu inkubacije

U dvije Erlenmeyerove tikvice od 100 mL doda se 25 mL otopine škroba u jednu i 25 mL otopine ekstrakta slada/amilaze u drugu. Sadržaj u tikvicama se inkubira 10 minuta na 40°C. Za to se vrijeme prirede staklene čašice od 10 mL u koje se redom doda po 5 mL ATIS otopine. Zaporni sat se uključi u trenutku dodavanja otopine škroba otopini slada/amilaze. U određenim vremenskim intervalima pipetira se 4 mL inkubacijske smjese i dodaje otopini ATIS-a. Potencijal sustava mjeri se nakon što se temperatura sadržaja u staklenim čašicama spusti na sobnu temperaturu. Za svaki uzorak slada i pripadajuće amilaze mjerenje se ponavlja 5 puta. Mjerenja su napravljena i za otopine ekstrakta slada/amilaze koji su prethodno inkubirani na 70°C 15 minuta.

3.3.1. UTJECAJ TEMPERATURE I pH VRIJEDNOSTI [33]

Za ispitivanje utjecaja temperature i pH vrijednosti na aktivnost slada i amilaza, uzorci otopina ekstrakta dodatno su tretirani. Utjecaj temperature ispitan je na tri različite temperature: 0°C, sobna temperatura (22°C) i 70°C. Uzorci su inkubirani 15 minuta na zadanim temperaturama, dovedeni na sobnu temperaturu i na kraju tretirani kao što je opisano na početku poglavlja. Utjecaj pH vrijednosti ispitan je pri pH=3,3 i pH=7 (pH vrijednost uzoraka prilagođena je dodatkom 0,5 M otopine klorovodične kiseline ili 0,5 M otopine natrijevog hidroksida).

3.3.2. NEFILTRIRANI EKSTRAKT SLADA

Oba načina potenciometrijskih mjerenja provedena su i za ekstrakt slada koji u završnoj fazi nije filtriran, te su rezultati uspoređeni s onima dobivenim od filtriranog ekstrakta. Alikvoti nefiltriranog ekstrakta slada uzeti su iznad taloga jednu minutu nakon miješanja uzorka i zatim inkubirani jedan na 22°C, a drugi na 70°C 15 minuta.

3.3.3. UTJECAJ UDJELA α-AMILAZE

Priređene su epruvete s različitim volumenima α-amilaze i β-amilaze kao što je prikazano u Tablici 2. Jedan set uzoraka inkubiran je na 70°C 15 minuta dok je drugi ostavljen na 22°C. Zatim su uzorci prebačeni u vodenu kupelj na 40°C i svakoj epruveti dodano je 2 mL otopine škroba. Nakon 10 minuta svakoj epruveti dodano je 5 mL ATIS otopine i izmjeren potencijal sustava.

Tablica 2. *Shema pripreme uzoraka s različitim udjelima amilaza u smjesi*

Udio α-amilaze / %	100	87,5	75	62,5	50	37,5	25	12,5	0
V(α-amilaza) / mL	2,00	1,75	1,50	1,25	1,00	0,75	0,50	0,25	0,00
V(β-amilaza) / mL	0,00	0,25	0,50	0,75	1,00	1,25	1,50	1,75	2,00

3.3.4. PHADEBAS TEST

Aktivnost amilaza u uzorcima ječmenog slada mjerena je i korištenjem Phadebas testa. Tableta netopljivog, plavo obojenog, umreženog škroba korištena je kao supstrat za razgradnju.Po 5 mL svake od otopina ekstrakata α-amilaza prebačene su u epruvete i inkubirane na 40°C 10 minuta. Otopine ekstrakata su zbog visoke aktivnosti dodatno razrijeđene. Slijepa proba priređena je dodatkom 5 mL CS-a i tretirana na isti način kao i uzorci. Nakon dodavanja Phadebas tablete u sve epruvete pokrenut je zaporni sat. Epruvete su izvađene iz vodene kupelji, protrešene i zatim brzo vraćene nazad u kupelj. Nakon 30 minuta reakcija je prekinuta dodatkom 1 mL otopine natrijevog hidroksida (1 M), te je smjesa ponovno protrešena i zatim filtrirana. Apsorbancija tako pripremljenih uzoraka mjerena je pri 620 nm, uz deioniziranu vodu kao referentni uzorak. Apsorbancija slijepe probe oduzeta je od apsorbancija dobivenih za uzorke. Izmjerena apsorbancija uzorka direktno je proporcionalna aktivnosti uzorka, ako su uzorci tretirani točno prema opisanom postupku.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. POTENCIOMETRIJSKA STUDIJA SUSTAVA ŠKROB-EKSTRAKT SLADA/AMILAZE-TRIJODID

Škrob s trijodidnim ionom stvara tamnoplavi kompleks. Amilaza katalizira hidrolizu škroba što je moguće pratiti potenciometrijski, mjerenjem promjene (povećanja) koncentracije trijodidnog iona (tijekom razgradnje škroba dolazi do oslobađanja trijodidnih iona iz kompleksa škrob-trijodid).[13]

Trijodidni ion postoji samo u suvišku jodidnog iona. Za reakciju

$$I_3^- + 2e^- \leftrightarrow 3I^- \tag{10}$$

vrijedi Nernstov izraz:

$$E = E^\circ + \frac{RT}{2F} ln \frac{[I_3^-]}{[I^-]^3} = E^\circ + \frac{2{,}303RT}{2F} log \frac{[I_3^-]}{[I^-]^3} = E^\circ + S \cdot log \frac{[I_3^-]}{[I^-]^3} \tag{11}$$

Promjena koncentracije trijodidnog iona izaziva promjenu omjera redoks para I_3^-/I^- što rezultira promjenom elektrodnog potencijala prema Nernstovoj jednadžbi:

$$E = E^\circ + S \cdot log \frac{[I_3^-]_0}{[I^-]} \tag{12}$$

gdje je: S – nagib elektrode

$[I_3^-]_0$– početna koncentracija trijodidnog iona

$[I^-]$ – koncentracija jodidnog iona (u suvišku, može se smatrati konstantnom).

Dodatkom amilaze dolazi do povećanja koncentracije trijodidnog iona:

$$E = E^\circ + S \cdot log \frac{[I_3^-]_0 + [I_3^-]_f}{[I^-]} \tag{13}$$

gdje je: $[I_3^-]_f$- povećanje koncentracije trijodidnog iona (oslobođenih iz kompleksa).

Ako povećanje koncentracije zapišemo kao umnožak koncentracija amilaze i koeficijenta proporcionalnosti

$$[I_3^-]_f = k \cdot c_\alpha \tag{14}$$

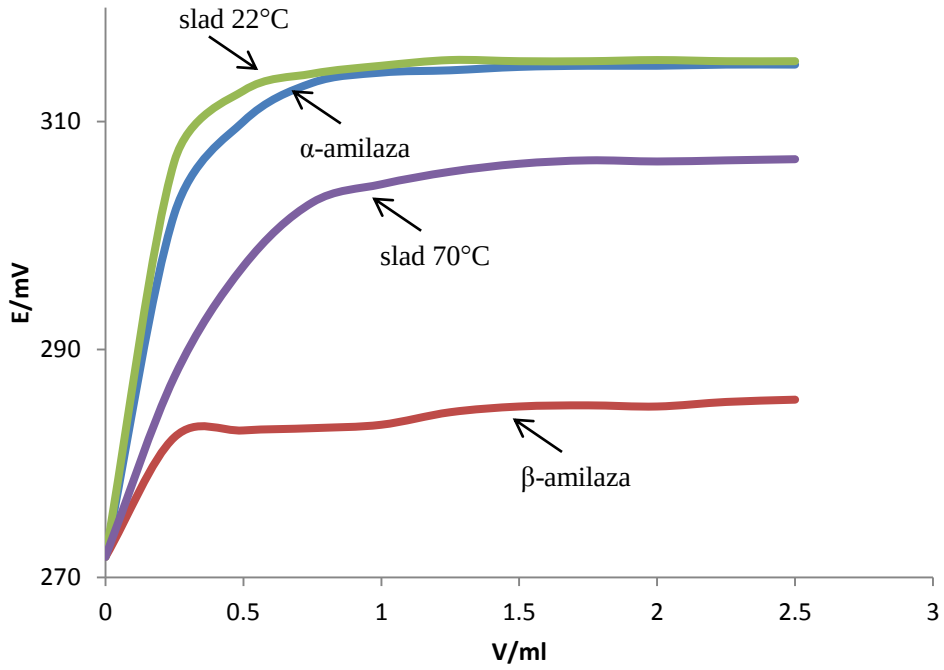
i uvrstimo u jednadžbu dobijemo:

$$E = E^{\circ} + S \cdot log \frac{[I_3^-]_0 + k \cdot c_\alpha}{[I^-]} \quad (15)$$

Iz predloženog teorijskog modela vidljivo je da je potencijal sustava proporcionalan logaritmu koncentracije amilaze, a time i njenoj aktivnosti.[13]

4.2. OVISNOST POTENCIJALA SUSTAVA ŠKROB-EKSTRAKT SLADA-TRIJODID O KONCENTRACIJI SLADA/AMILAZE I VREMENU INKUBACIJE

Za potvrđivanje hipoteze rada iz jednog uzorka slada priređeni su ekstrakt slada te ekstrakti pripadajuće α- i β-amilaze. Ekstrakt slada dodatno je razdvojen na dva dijela, od kojih je jedan inkubiran na 70°C 15 minuta, što bi trebalo inaktivirati β-amilazu. Rezultati mjerenja ovisnosti potencijala o volumenu prikazani su na Slici 12.

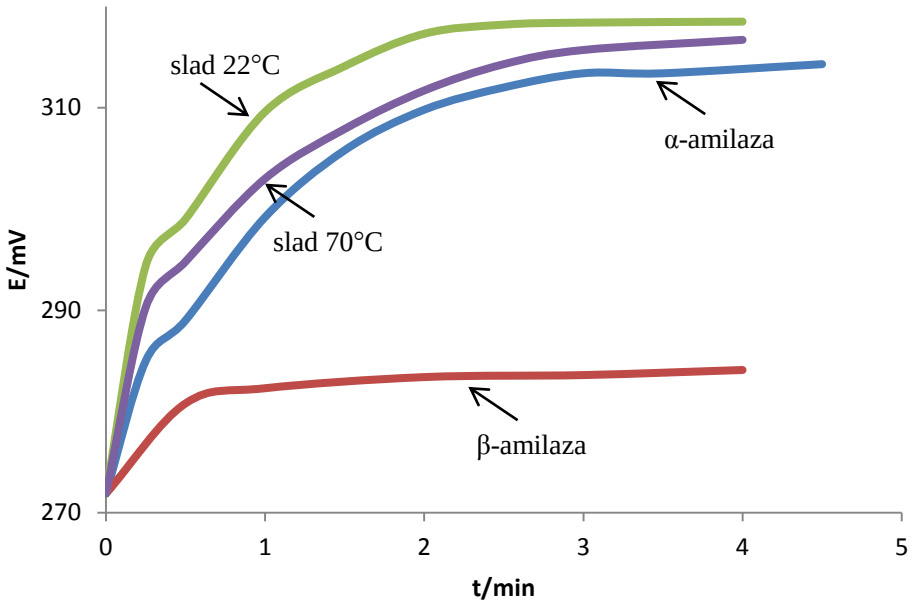


Slika 12. *Ovisnost potencijala sustava škrob-ekstrakt slada/amilaze-trijodid o volumenu slada/amilaze*

Porast potencijala sustava za mjerenja sa sladom i α-amilazom podjednak je. α-Amilaza ipak ima nešto slabiji skok, što je očekivano budući da se u sladu nalaze obje amilaze. Slad prethodno inkubiran na 70°C ima slabiji porast potencijala, a razlika između njega i običnog slada otprilike odgovara aktivnosti β-amilaze, što potvrđuje činjenicu da pri temperaturi od 70°C dolazi do inaktivacije β-amilaze.

Slična situacija je i na Slici 13. gdje je prikazana ovisnost potencijala o vremenu inkubacije. Slad prethodno inkubiran na 70°C 15 minuta pokazuje manju aktivnost nego obični slad pri čemu razlika otprilike odgovara aktivnost β-amilaze, dakle zagrijavanjem na

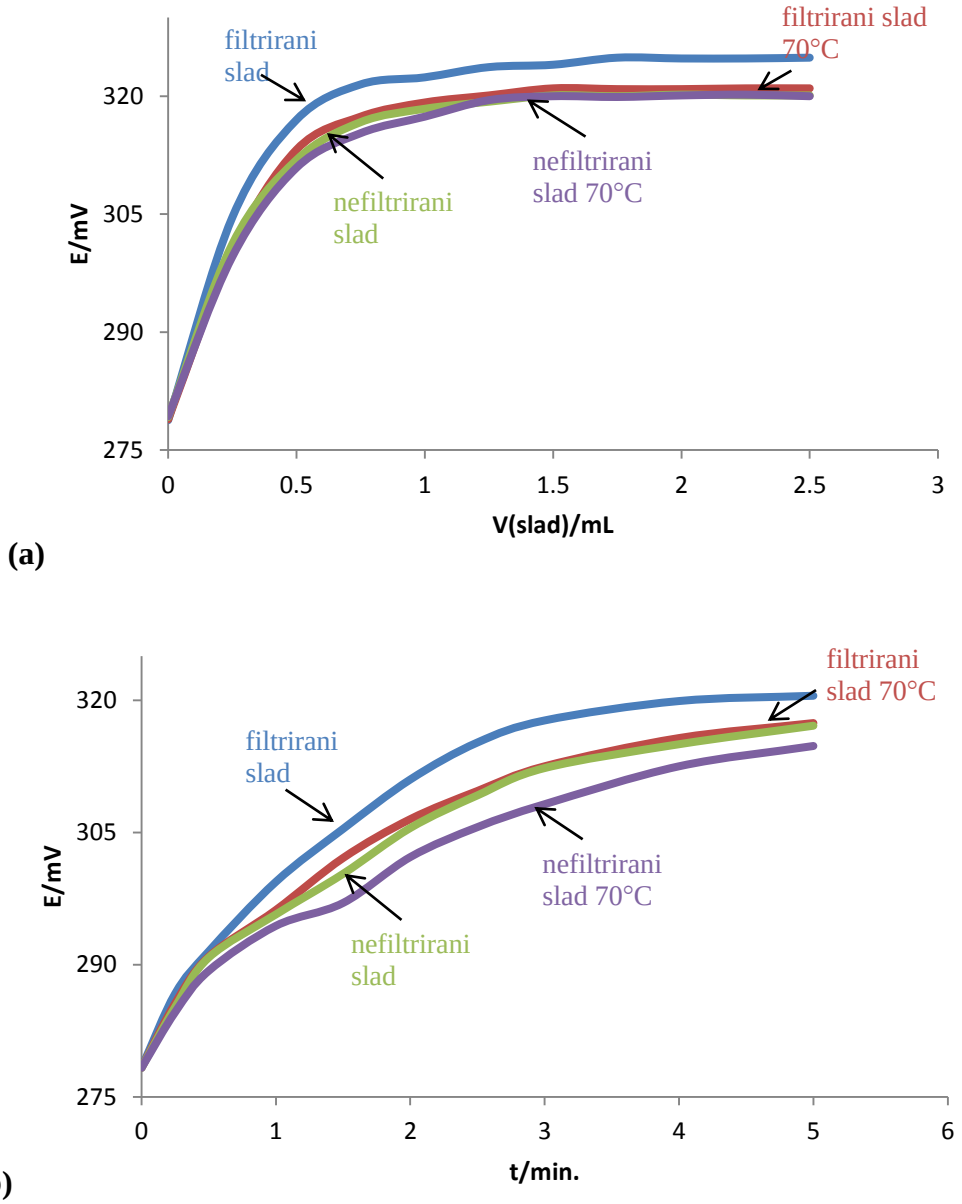
70°C dolazi do inaktivacije β-amilaze. Krivulje za slad na 70°C i α-amilazu u ovom su mjerenju "zamijenile mjesta" pa se na ovoj slici bolje vidi kako je obični slad smjesa α- i β-amilaze. Stoga bi se mjerenje ovisnosti potencijala o vremenu inkubacije moglo pokazati točnije za određivanje same aktivnosti amilaza.



Slika 13. *Ovisnost potencijala sustava škrob-ekstrakt slada/amilaze-trijodid o vremenu inkubacije*

4.3. RAZLIKA U MJERENJIMA IZMEĐU FILTRIRANIH I NEFILTRIRANIH UZORAKA SLADA

Elektroanalitičkim metodama zamućenost i obojanost otopine ne smetaju. Kako bi se istražilo koliko se zapravo razlikuju rezultati dobiveni u mjerenjima između bistrih i zamućenih otopina, priređeni su uzorci ekstrakta istog slada, od kojih jedan po završetku ekstrakcije nije filtriran. Rezultati su prikazani na Slici 14.



Slika 14. *Razlike u mjerenjima između filtriranih i nefiltriranih uzoraka slada; (a) ovisnost potencijala o volumenu i (b) ovisnost potencijala o vremenu*

Rezultati su pokazali kako među mjerenjima ipak postoji razlika, iako ona nije velika. U oba slučaja razlika između konačne vrijednosti potencijala između filtriranog i nefiltriranog uzorka je oko 5 mV. Kako se u ekstraktu nefiltriranog slada zadržavaju sitne netopljive čestice, možemo zaključiti da one utječu na mjerenje aktivnosti amilaza, tj. aktivnost amilaza u sladu se kod uzoraka koji nisu filtrirani može pokazati manjom nego što zapravo jest.

4.4. UTJECAJ TEMPERATURE, pH VRIJEDNOSTI I PRISUTNOSTI KALCIJEVIH IONA NA PONAŠANJE α- I β- AMILAZE

Mjerenja utjecaja različitih uvjeta na aktivnost amilaza provedena su kako bi se točnije odredili uvjeti pri kojima dolazi do inaktivacije jedne od amilaza, uz maksimalnu retenciju druge. Dobivena opažanja i rezultati prikazani su u Tablici 3.

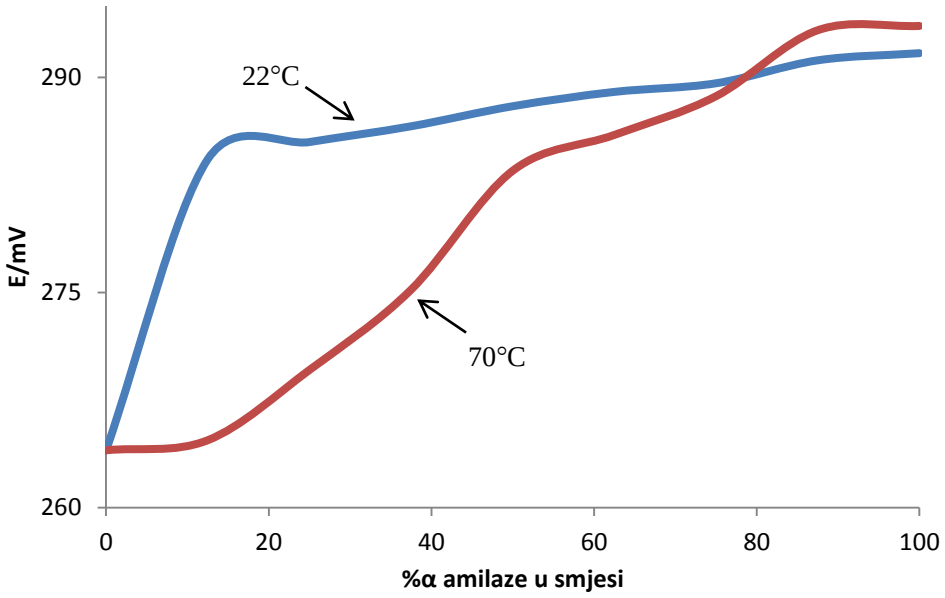
Tablica 3. *Ponašanje α- i β-amilaze pri različitim temperaturama i pH vrijednostima, te u prisutnosti kalcijevih iona*

	α-amilaza	**β-amilaza**
pH≈3,3	inaktivirana	aktivirana
pH≈7	aktivirana	djelomično aktivirana
t=0°C	inaktivirana	djelomično aktivirana
t=22-30°C	umjereno aktivirana	aktivirana
t=70°C	aktivirana	inaktivirana
prisutnost Ca^{2+}	aktivirana, dovoljno 0,1 mg po mL amilaze za stabilizaciju	0,5 mg po mL amilaze potrebno za destabilizaciju

Za inaktivaciju α-amilaze potrebni su niska pH vrijednost, niska temperatura i odsutnost kalcijevih iona u otopini (α-amilaza je metaloenzim kojemu je za djelovanje potreban kalcij u aktivnom centru). Najveća zabilježena aktivnost α-amilaze je iznad 35°C i približno neutralnoj pH vrijednosti. Inaktivacija β-amilaze postiže se pri visokoj temperaturi, dovoljnoj koncentraciji kalcijevih iona i približno neutralnom pH, dok je najveća aktivnost zabilježena pri pH=3,3 i temperaturama oko 30°C.

4.5. OVISNOST POTENCIJALA SUSTAVA ŠKROB-SMJESA α- I β-AMILAZE-TRIJODID O RAZLIČITIM UDJELIMA AMILAZA

Priređene su dvije serije uzoraka s različitim omjerima ekstrakata α- i β-amilaze, od kojih je jedna prethodno inkubirana na 70°C, kako bi se provjerilo koliko udio α-amilaze utječe na promjenu potencijala sustava. Rezultati su prikazani grafički na Slici 15.

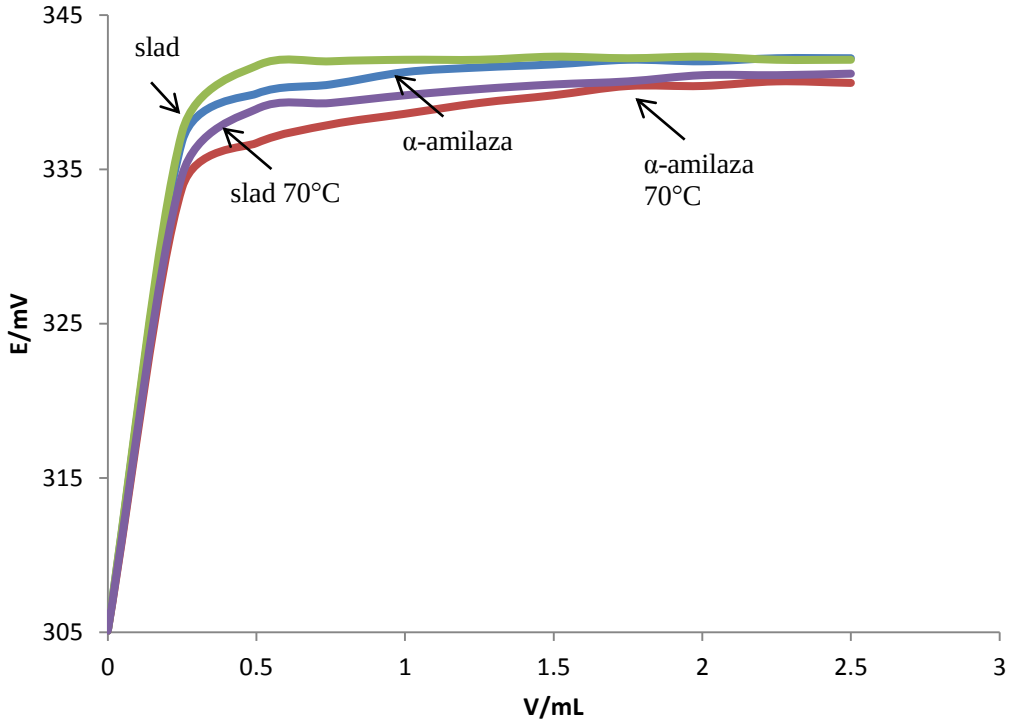


Slika 15. *Ovisnost potencijala sustava o udjelu α-amilaze u smjesi*

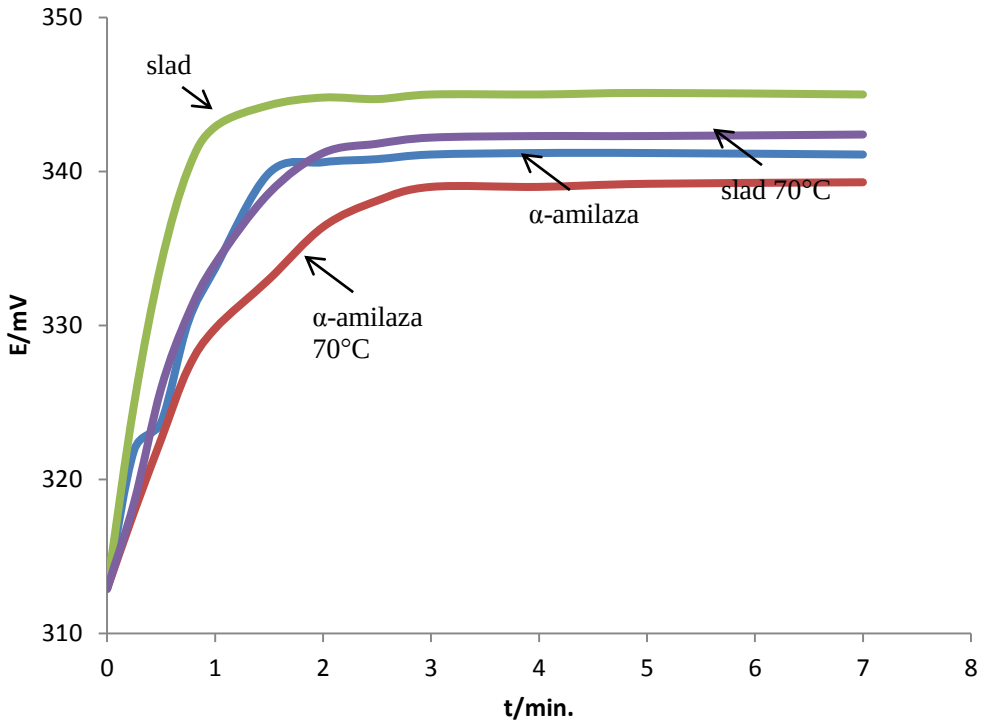
Pri 22°C već 10% α-amilaze u smjesi dovoljno je za izraženi skok potencijala. Daljnjim povećavanjem udjela potencijal sustava se neznatno, ali proporcionalno povećava. Kod serije uzoraka koja je inkubirana na 70°C do većeg skoka u potencijalu dolazi tek pri 50% α-amilaze u smjesi. Ovi se rezultati mogu objasniti činjenicom da su pri 22°C obje amilaze aktivne i zajedno razgrađuju škrob te je zbog toga razlika potencijala vidljiva s prvim dodatkom α-amilaze u smjesu. Pri 70°C treba doći do inhibicije β-amilaze, što znači da je, bez obzira na njen udio, α-amilaza jedini aktivni enzim u smjesi te joj treba više vremena, a samim time i veća koncentracija, kako bi razgradila istu količinu škroba.

4.6. OVISNOST POTENCIJALA O KONCENTRACIJI I VREMENU INKUBACIJE ZA RAZLIČITE UZORKE SLADOVA

Istraživanje je obuhvatilo šest različitih uzoraka sladova dobivenih iz Osječke pivovare. Iz svakog slada izolirana je α-amilaza, a uz ta dva uzorka dodani su i pripadajući uzorci koji su prethodno inkubirani na 70°C. Provedeno je pet nezavisnih mjerenja odziva elektrode za svaki uzorak. Na Slici 16. (a) i (b) prikazani su odzivi elektrode u ovisnosti o volumenu (koncentraciji) slada/amilaze te o vremenu inkubacije za jedno nezavisno mjerenje. Početne točke svih mjerenja namještene su u istu točku radi bolje preglednosti slike i usporedbe rezultata.



(a)



(b)

Slika 16. *Odzivi elektrode (a) u ovisnosti o volumenu i (b) u ovisnosti o vremenu inkubacije za slad 5, prikazano je po jedno nezavisno mjerenje*

Nakon obrade rezultata pokazalo se da svi obrađeni sladovi prate sličan trend u porastu potencijala sustava. Najviši skok pokazuje ekstrakt slada, slijede ga ekstrakt α-amilaze i slad prethodno inkubiran na 70°C koji imaju približno jednak skok. Najmanji skok potencijala pokazao je ekstrakt α-amilaze prethodno inkubiran na 70°C.

Prema dobivenim rezultatima najvišu aktivnost pokazuje ekstrakt slada, što je i logično budući da sadrži obje amilaze. Ekstrakt α-amilaze i slad prethodno inkubiran na 70°C imaju podjednaku aktivnost jer se inkubacijom na 70°C inhibira veći dio β-amilaze. Ekstrakt α-amilaze prethodno inkubiran na 70°C ima najnižu aktivnost jer se, iako je termostabilna, pri toj temperaturi ipak inhibira mali dio α-amilaze

4.7. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI α-AMILAZE IZ SLADA MJERENJEM OVISNOSTI POTENCIJALA SUSTAVA O VREMENU INKUBACIJE – USPOREDBA S PHADEBAS TESTOM

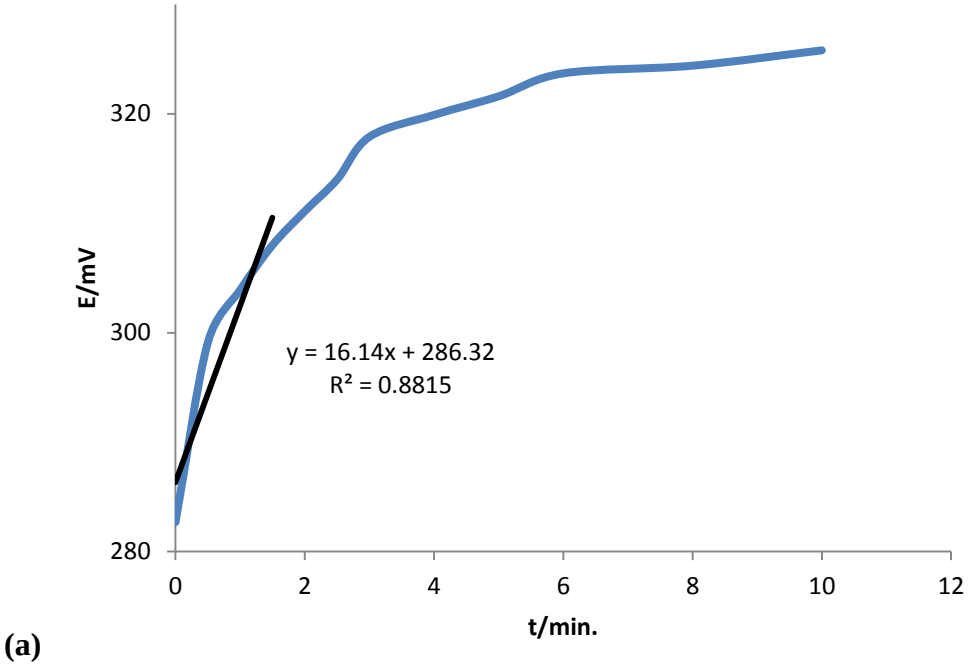
Za usporedbu dobivenih rezultata korišten je komercijalni Phadebas test za mjerenje aktivnosti α-amilaze, kojim su izmjerene aktivnosti svih ekstrakata α-amilaza iz sladova. Od eksperimentalnih podataka dobivenih potenciometrijskom metodom uzeti su grafovi koji prikazuju ovisnost potencijala sustava o vremenu inkubacije za α-amilaze i za sladove inkubirane na 70°C, u kojima bi sva β-amilaza trebala biti inhibirana.

U Tablici 4. prikazani su konačni rezultati Phadebas testa i aktivnosti za svaki uzorak slada u jedinicama μmol $s^{-1}L^{-1}$(μkatL^{-1}) i U L^{-1} izračunati prema tabličnim vrijednostima danima uz test (U L^{-1}= 0,0167μkatL^{-1}= 0,0167μmol $s^{-1}L^{-1}$).

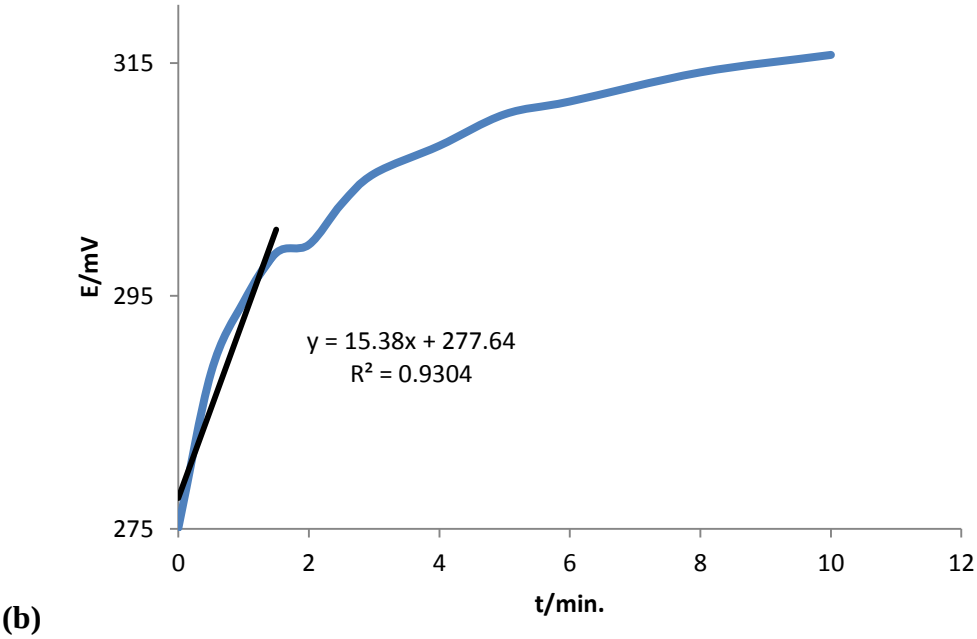
Tablica 4. *Rezultati dobiveni pomoću Phadebas testa*

Slad	Razrjeđenje uzorka	Apsorbancija na 620nm	Aktivnost/ μmol $s^{-1}L^{-1}$	Aktivnost/ U L^{-1}
A	1	1,7810	16,84	1010,6
B	1:2	1,0477	26,26	1575,4
C	1:1	0,8631	16,41	984,7
0	1:2	1,9829	41,57	2495,1
4	1:2	2,0387	42,34	2540,2
5	1:1	1,8743	29,09	1747,6

Za određivanje aktivnosti iz podataka dobivenih potenciometrijskim mjerenjima korištene su točke krivulje u rasponu od 0 do 1,5 minuta, jer je unutar tog vremenskog intervala najveći skok potencijala (kod mjerenja koja nisu imala dovoljan broj točaka korištena je metoda srednje vrijednosti kako bi bilo dovoljno podataka za analizu). Za svaku krivulju određen je pravac (tangenta), čiji nagib odgovara aktivnosti tog uzorka (Sl.17.). Srednje vrijednosti nagiba za sva mjerenja dane su u Tablici 5.



(a)



(b)

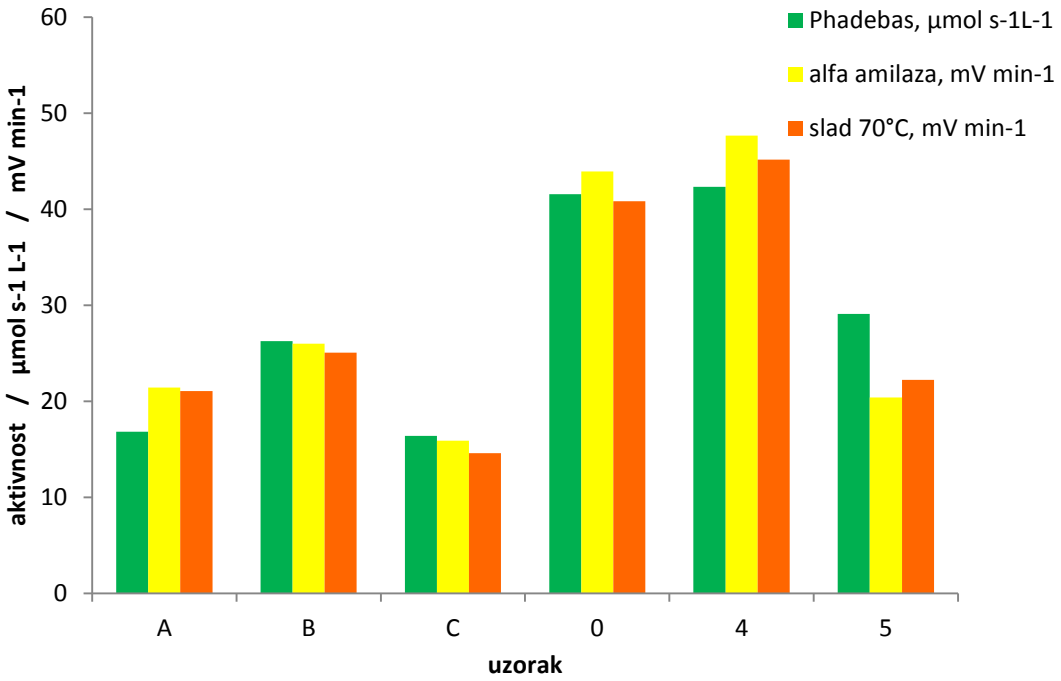
Slika 17. *Određivanje nagiba za (a) aktivnost α-amilaze u sladu C, i (b) aktivnost slada C nakon inkubacije na 70°C*

Tablica 5. *Srednje vrijednosti nagiba i pripadajućih R^2 vrijednosti za ekstrakte α-amilaza iz sladova te pripadajuće sladove nakon inkubacije na 70°C*

	$\overline{S}$	$\sigma\,\overline{S}$	$\overline{R^2}$	$\sigma\,\overline{R^2}$
Slad A	21,07 ± 1,17	1,01	0,8666 ± 0,0124	0,016
α-amilaza A	21,43 ± 0,80	0,49	0,940 ± 0,019	0,017
Slad B	25,08 ± 1,02	0,66	0,882 ± 0,038	0,036
α-amilaza B	26,00 ± 1,10	0,70	0,9702 ± 0,0158	0,017
Slad C	14,60 ± 0,78	0,55	0,8316 ± 0,0984	0,076
α-amilaza C	15,89 ± 0,25	0,24	0,8514 ± 0,0296	0,020
Slad 0	40,83 ± 1,34	2,17	0,8166 ± 0,0304	0,018
α-amilaza 0	43,94 ± 0,45	0,40	0,7872 ± 0,0198	0,016
Slad 4	45,18 ± 1,58	1,50	0,7216 ± 0,0814	0,049
α-amilaza 4	47,66 ± 1,01	0,94	0,7514 ± 0,0586	0,047
Slad 5	22,24 ± 0,72	0,48	0,9818 ± 0,0092	0,005
α-amilaza 5	20,40 ± 1,48	0,85	0,9738 ± 0,0122	0,010

Među rezultatima mjerenja unutar istog uzorka većinom nije bilo velikih odstupanja. Srednje vrijednosti nagiba za sladove prethodno obrađene na 70°C ne odstupaju puno od vrijednosti dobivenih za pripadajuće α-amilaze. R^2 vrijednosti kreću se između 0,8 i 0,99, uz iznimku oba uzorka slada 4 i uzorka α-amilaze 0 čije su vrijednosti između 0,7 i 0,8.

Dobivene vrijednosti nagiba u oba se slučaja dobro poklapaju s aktivnostima izračunatim pomoću Phadebas testa, što se može vidjeti na Slici 18.



Slika 18. Usporedba završnih rezultata za aktivnost α-amilaze u sladu

Vrijednosti nagiba za α-amilaze u većini su slučajeva nešto više od vrijednosti pripadajućih sladova tretiranih na 70°C, osim u slučaju uzorka slada 5 gdje je situacija obrnuta. U tri uzorka izmjerene vrijednosti nagiba nešto su niže od aktivnosti dobivenih Phadebas metodom, dok su u tri uzorka više. Najveće odstupanje od Phadebas metode pokazalo se u posljednjem uzorku slada.

5. ZAKLJUČAK

U ovom je radu predstavljena nova metoda za određivanje amilaza, točnije α-amilaze u sladu. Metoda se temelji na direktnom potenciometrijskom određivanju slobodnog trijodidnog iona koji se oslobodi iz kompleksa škrob-trijodid uslijed razgradnje škroba amilazama pomoću platinske redoks elektrode kao detektora.

Uz metodu određivanja, u radu su opisane i neke karakteristike amilaza iz slada, te su utvrđeni jednostavni uvjeti uz koje može doći do inhibicije jedne od amilaza u svrhu istraživanja druge.

Opisana metoda određivanja amilaza u sladu je elektroanalitička (zamućenost i obojanost otopine ne smetaju znatnije mjerenju), brza (aktivnost uzorka može se izmjeriti unutar jedne i pol minute), jednostavne izvedbe (nije potrebna komplicirana aparatura) i jeftina (nisu potrebni specijalni reagensi). Velika prednost nad drugim dostupnim metodama je i mogućnost određivanja ukupne aktivnosti amilaza u sladu kao i pojedinačne aktivnosti α- ili β-amilaze u sladu, ovisno o prethodnom tretiranju uzorka.

Usporedba metode s komercijalnim Phadebas testom dala je dobre rezultate, što potvrđuje hipotezu da je aktivnost amilaze proporcionalna koncentraciji oslobođenog trijodidnog iona i naposljetku i promjeni elektrodnog potencijala sustava.

Rezultati predložene metode pokazali su zadovoljavajuću točnost i preciznost. Kako bi metoda bila što točnija i s manjim odstupanjima među mjerenjima, umjesto korištenja 4%-tne otopine ekstrakta slada/amilaze može se koristiti 2%-tna otopina. To bi povećalo trajanje mjerenja na 4-5 minuta, ali i rezultiralo većim brojem podataka za daljnju analizu.

6. METODIČKI DIO

6.1. PRIPREMA ZA IZVOĐENJE NASTAVNOG SATA

ŠKOLA	Osnovna škola
PREDMET	Kemija
RAZRED	8.razred
NASTAVNA CJELINA	Biološki važni spojevi
NASTAVNA JEDINICA	Enzimi
CILJ NASTAVNE JEDINICE	Povezati pojam enzima s katalizatorima, objasniti njihov princip djelovanja te prepoznati enzimske reakcije u organizmu i svakodnevnom životu.
ISHODI UČENJA:	
Kognitivni	Definirati pojmove enzim, supstrat, aktivno mjesto, biokatalizator. Poznavati ulogu enzima u organizmu. Navesti primjere primjene enzima u svakodnevnom životu.
Afektivni	Razviti naviku zajedničke suradnje u grupi. Samostalno izvoditi zaključke na temelju pokusa.
Psihomotorički	Samostalno izvoditi jednostavnije kemijske pokuse. Povezati novo gradivo s već naučenim pojmovima te uočiti korelaciju s drugim predmetima.
POTREBNA PREDZNANJA	Škrob, dokazivanje škroba, katalizatori, vrenje, bjelančevine, dokazivanje bjelančevina
TIP NASTAVNOG SATA	Obrada novog gradiva (blok sat)
NASTAVNE METODE	Usmeno izlaganje, demonstracija, razgovor
NASTAVNA SREDSTVA	Udžbenik, PowerPoint prezentacija, epruvete, kapalice, tarionik s tučkom, staklene čaše, Erlenmeyerove tikvice, trješčice, otopina škroba, Lugolova otopina, enzimski preparat, otopina NaOH, razrijeđena otopina $CuSO_4$, destilirana voda, otopina vodikovog peroksida (10-20%), uzorci sirove i kuhane jetrice, mrkve i krumpira, bojice
NASTAVNA POMAGALA	Projektor, ploča, grafoskop, računalo
OBLICI RADA	Frontalni, rad u skupinama
KORELACIJA S DRUGIM PREDMETIMA	Biologija
LITERATURA	Draginja Mrvoš Sermek, Nikolina Ribarić *KEMIJA 8, udžbenik iz kemije za osmi razred osnovne škole*

6.2. STRUKTURA NASTAVNOG SATA

ETAPA I TRAJANJE	SADRŽAJ	METODE	SREDSTVA I POMAGALA
Uvod 10 minuta	Ponavljanje: bjelančevine	Postavljanje pitanja, razgovor s učenicima	PowerPoint prezentacija
Glavni dio – obrada 10 minuta	Predstavljanje teme Što su enzimi? - biokatalizatori Kako su građeni enzimi? Kakve reakcije kataliziraju?	Usmeno izlaganje, razgovor	PowerPoint prezentacija, ploča
10 minuta	**DEMONSTRACIJSKI POKUS** Enzimi=bjelančevine? - Dokazivanje sastava enzima pomoću Biuret testa. - Komentiranje zapažanja i izvođenje zaključaka.	Demonstracija, postavljanje pitanja, razgovor	Radni listići, bojice, epruveta, kapalice, tarionik s tučkom, tableta enzimskog preparata, otopina natrijevog hidroksida, otopina bakrovog(II) sulfata
15 minuta	Princip rada enzima – mehanizam ključ-brava - Objašnjenje pojmova supstrat i aktivno mjesto	Usmeno izlaganje, demonstracija	PowerPoint prezentacija, ploča
10 minuta	**POKUS U GRUPAMA** Razgradnja škroba pomoću amilaze iz sline. - Što je amilaza i gdje se nalazi? - Komentiranje zapažanja i izvođenje zaključaka.	Rad u grupama po 5 ili 6 učenika, postavljanje pitanja, razgovor	Radni listići, ploča, bojice, staklena čaša za prikupljanje sline, epruveta, otopina škroba, Lugolova otopina, otopina klorovodične kis., kapalice

15 minuta	**POKUS U GRUPAMA** Raspad vodikovog peroksida pomoću katalaze iz jetrice, krumpira ili mrkve. - Što je katalaza? - Razlika između kemijskih katalizatora i enzima (podsjećanje na pokus *Raspad vodikovog peroksida uz MnO_2 kao katalizator*) - Komentiranje zapažanja i izvođenje zaključaka.	Rad u grupama po 5 ili 6 učenika, postavljanje pitanja, razgovor	Radni listići, ploča, bojice, Erlenmeyerove tikvice, uzorci jetrice (sirovi i kuhani), mrkve, krumpira, žlica, otopina vodikovog peroksida, trješčica
10 minuta	Enzimi u organizmu i svakodnevnom životu (biološki procesi, fermentacija, detergenti za rublje, kvasac...)	Razgovor, diskusija	PowerPoint prezentacija, ploča
Završetak – ponavljanje 10 minuta	Zadavanje domaće zadaće – zadatci iz radne bilježnice Ponavljanje najvažnijih pojmova	Postavljanje pitanja, razgovor	Ploča, radna bilježnica

6.3. PLAN PLOČE I RADNI LISTIĆI UZ POKUSE

datum

ENZIMI

Enzimi – prirodni katalizatori – **biokatalizatori**

Supstrat – tvar na koju enzim djeluje

Aktivno mjesto – mjesto na kojem se supstrat veže na enzim

POKUS 1

Enzimi=bjelančevine? Biuret reakcija.

Skica:

Opažanja:

Zaključak:

POKUS 2

Razgradnja škroba pomoću amilaze iz sline.

Amilaza – ubrzava razgradnju škroba na maltozu i glukozu

Skica:

$(C_6H_{10}O_5)n \rightarrow mC_6H_{12}O_6 + pC_{12}H_{22}O_{11}$

Opažanja:

Zaključak:

POKUS 3.

Raspad vodikovog peroksida pomoću katalaze iz jetrice, krumpira ili mrkve.

Katalaza – ubrzava razgradnju vodikovog peroksida na kisik i vodu

Skica:

$2H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2H_2O$

Opažanja:

Zaključak:

RADNI LISTIĆ 1

Enzimi=bjelančevine?

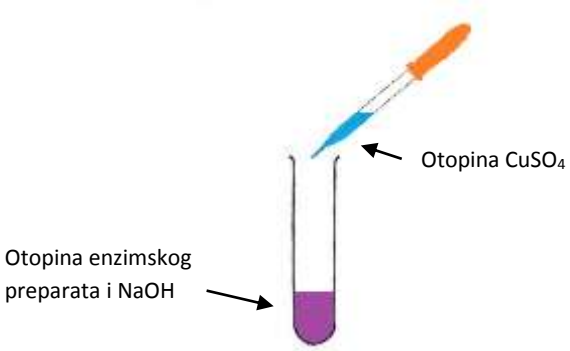
PRIBOR I KEMIKALIJE

Epruveta, kapalice, tarionik s tučkom, tableta enzimskg preparata (npr. Digestin – *Dietpharm* ili neki drugi preparat koji sadrži digestivne enzime), otopina NaOH, razrijeđena otopina $CuSO_4$, destilirana voda

POSTUPAK

Tabletu enzimskog preparata smrvimo u tarioniku i prebacimo u epruvetu te ju otopimo u maloj količini destilirane vode. Otopini u epruveti dodamo nekoliko kapi otopine NaOH i nekoliko kapi razrijeđene otopine $CuSO_4$ te sadržaj epruvete protresemo.

SKICA



OPAŽANJA

Dodatkom otopina NaOH i $CuSO_4$, smjesa u epruveti poprimila je karakterističnu ljubičastu boju.

ZAKLJUČAK

Otopina enzimskog pripravka pokazala je pozitivnu reakciju na Biuret test, što ukazuje na prisutnost peptidnih veza u enzimima.

RADNI LISTIĆ 2

Razgradnja škroba pomoću amilaze iz sline

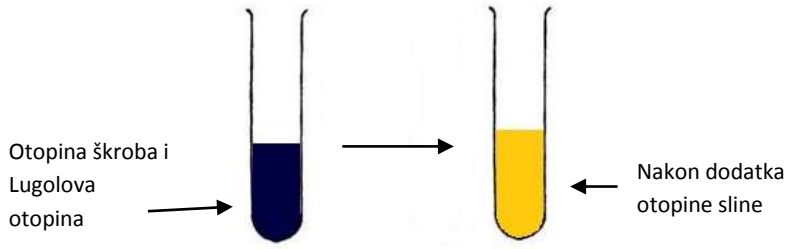
PRIBOR I KEMIKALIJE

Staklena čaša, epruveta, kapalice, otopina škroba, Lugolova otopina, destilirana voda

POSTUPAK

U staklenu čašu prikupimo slinu i razrjedimo ju s malo destilirane vode. Za to vrijeme u epruvetu ulijemo otopinu škroba i dodamo joj nekoliko kapi Lugolove otopine. Dobivenoj smjesi u epruveti dodamo malo otopine sline i epruvetu grijemo među dlanovima dok ne primijetimo prve promjene.

SKICA



OPAŽANJA

Dodatkom Lugolove otopine otopini škroba ona je poprimila tamnoplavu boju. Dodatak otopine sline uzrokovao je gubitak tamnoplave boje te je smjesa u epruveti poprimila žuto-narančastu boju.

Što je amilaza?

Enzim koji ubrzava razgradnju škroba na jednostavnije ugljikohidrate. Nalazi se u biljkama, životinjama i mikroorganizmima. Kod čovjeka predstavlja važan probavni enzim.

Zašto nam je bila potrebna Lugolova otopina?

Pomoću Lugolove otopine dokazuje se prisutnost škroba (nastaje tamnoplavo obojenje).

REAKCIJA

$(C_6H_{10}O_5)n \rightarrow mC_6H_{12}O_6 + pC_{12}H_{22}O_{11}$

ZAKLJUČAK

Amilaza iz sline razgradila je škrob na jednostavnije šećere što smo dokazali pomoću promjene boje Lugolove otopine.

RADNI LISTIĆ 3

Raspad vodikovog peroksida pomoću katalaze iz jetrice, krumpira ili mrkve

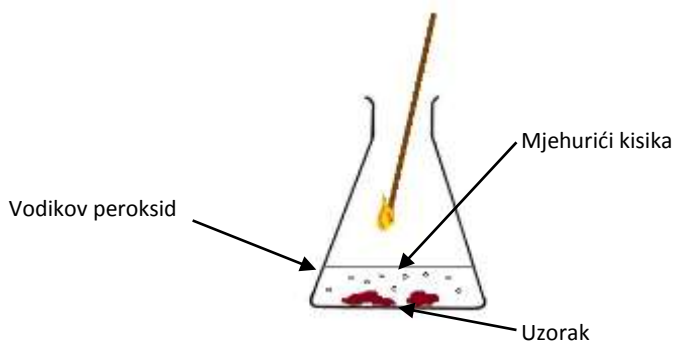
PRIBOR I KEMIKALIJE

Erlenmeyerova tikvica, žlica, trješčica, otopina vodikovog peroksida (10-20%), uzorci sirove i kuhane jetrice, mrkve i krumpira (sitno nasjeckani ili naribani)

POSTUPAK

U Erlenmeyerovu tikvicu stavimo malo dobivenog uzorka jetrice, mrkve ili krumpira. Zatim ulijemo otopinu vodikovog peroksida tako da uzorak bude potpuno prekriven. Nakon nekog vremena u tikvicu unesemo tinjajuću trješčicu.

SKICA



OPAŽANJA

Nakon nekog vremena iz otopine u tikvici počeli su izlaziti mjehurići. Unošenjem tinjajuće trješčice u tikvicu, trješčica je počela slabo gorjeti. U tikvici u kojoj je bio uzorak sirove jetrice mjehurići su nastajali puno brže nego u onoj s kuhanom jetricom.

Što je katalaza?

Enzim koji ubrzava raspad vodikovog peroksida na kisik i vodu. Zastupljena je kod gotovo svih organizama (i u čovjeku) te je važan čimbenik u antioksidacijskoj zaštiti organizma.

Koji plin dokazujemo tinjajućom trješčicom?

Tinjajućom trješčicom dokazujemo kisik.

REAKCIJA

$2H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2H_2O$

ZAKLJUČAK

Enzim katalaza, kojeg možemo naći u jetrici i povrću, ubrzava raspad vodikovog peroksida na vodu i kisik, kojeg smo dokazali pomoću tinjajuće trješčice.

7. LITERATURA

1. http://www.rpi.edu/dept/chem-eng/Biotech-Environ/beer/malt/barley1.htm (autor A.J. Schohn, ažurirano 30.4.1999., pregledano 20.6.2014.)
2. http://www.ireks-aroma.hr/Slad-za-proizvodnju-piva-i-pekarstvo.htm (ažurirano 12.2013., pregledano 11.7.2014.)
3. http://www.maltproducts.com/images/design/brewery.jpg (pregledano 2.8.2014.)
4. http://free-st.htnet.hr/jim/sast.html (pregledano 11.7.2014.)
5. N. Šakić, Tehnologija proizvodnje piva, Gospodarska komora Federacije Bosne i Hercegovine, Sarajevo 2005.
6. http://tehpiva.tripod.com/ (autor Z.Čamdžija, ažurirano 5.5.2000. pregledano 20.6.2014.)
7. http://2012.igem.org/wiki/images/thumb/5/54/TUM12_Beer_iodine.png/300px-TUM12_Beer_iodine.png (pregledano 2.8.2014.)
8. https://hocupivo.wordpress.com/2012/05/13/ukomljavanje-osnove/ (ažurirano 13.5.2012., pregledano 18.6.2014.)
9. http://www.britannica.com/EBchecked/topic/53494/barley (ažurirano 20.8.2013, pregledano 12.6.2014.)
10. http://luirig.altervista.org/cpm/albums/07c/006257-hordeum-vulgare.jpg (pregledano 2.8.2014.)
11. D. E. Briggs, C. A. Boulton, P. A. Brookes, R. Stevens, Brewing Science and Practice, Woodhead Publishing, 2004.
12. L. Stryer, Biochemistry II ed, Školska knjiga, Zagreb, 1991.
13. N. Sakač, M. Sak-Bosnar, M. Horvat, D. Madunić-Čaćić, A. Szechenyi, B. Kovacs, *Talanta* 83 (2011), 1606-1612

14. http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/6/66/Salivary_alpha-amylase_1SMD.png (pregledano 2.8.2014.)

15. L. Duedahl-Olesen, L. H. Pedersen, K. L. Larsen, *Carbohydr. Res.*, 329 (2000), 109–119

16. http://www.mrc-lmb.cam.ac.uk/genomes/date/1bya.gif (pregledano 2.8.2014.)

17. http://www.google.com/patents/US4337310 (ažurirano 2012., pregledano 11.8.2014.)

18. B.V. McCleary, M. McNally, D. Monaghan, D.C. Mugford, Measurement of α-amylase activity in white wheat flour, milled malt, and microbial enzyme preparations, using the Ceralpha assay: collaborative study. *J AOAC Int* 85 (2002), 1096-1102.

19. D. Clem, J. Maidment, J.M. Ringham, *Nutr. Food Sci.* 31 (2001) 141–146.

20. J. BeMiller, R. Whistler, Starch: Chemistry and Technology, Third edition, Elsevier, 2009.

21. http://38.media.tumblr.com/tumblr_lspll0vEVh1qhyly2o1_400.jpg (pregledano 2.8.2014.)

22. G. M. A. Van Beynum, J. A. Roles, Starch Conversion Technology, Marcel Dekker INC, New York and Basel, 1985.

23. R. Cohen, Y. Orlova, M. Kovalev, Y. Ungar, E. Shimoni, Structural and Functional Properties of Amylose Complexes with Genistein, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56** (11) (2008), 4212–4218.

24. http://chemistry.ewu.edu/jcorkill/biochem/amylose_helix.jpg (pregledano 2.8.2014.)

25. http://www1.lsbu.ac.uk/water/images/hyamp.gif (pregledano 2.8.2014.)

26. I. Filipović, S. Lipanović, Opća i anorganska kemija, Školska knjiga, Zagreb, 1995.

27. http://yteach.co.za/files/lessons/import_091104_132206/uc_c5t_l008/uc_c5t_l008_26.jpg (pregledano 2.8.2014.)

28. X. Yu, C.Houtman, R.H.Atalla, The complex of amylose and iodine, *Carbohydrate Research*, 292 (1996), 129-141

29. http://2.bp.blogspot.com/5gzIXKpfex4/T4E5EQzlTGI/AAAAAAAAAUQ/E3oaEEZSrUk/s1600/image002-717790.png (pregledano 2.8.2014.)

30. D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, Osnove analitičke kemije, Školska knjiga, Zagreb, 1999.

31. I. Piljac , Elektroanalitičke metode, RMC, Zagreb, 1995.

32. E. Kneen, R.M. Sandstedt, C.M. Hollenbeck, The Differential Stability of the Malt Amylases-Separation of the Alpha and Beta Components, *Cereal Chemistry*, vol. 20 (1943), 4, 399-433.

33. E. Bertoft, C. Andtfolk, S.E. Kulp, Effect of pH, temperature, and calcium ions on barley malt α-amylase isoenzymes. *Jnl Institute Brewing*, 90 (1984), 298–302.

8. ŽIVOTOPIS

Maja Karnaš rođena je 16. ožujka 1990. godine u Osijeku gdje je, 2008. godine, maturirala na Isusovačkoj klasičnoj gimnaziji s pravom javnosti. Iste godine upisuje Preddiplomski studij kemije na Odjelu za kemiju pri Sveučilištu J.J. Strossmayera u Osijeku te 2012. godine stječe akademski naziv prvostupnica kemije. Nakon toga na Odjelu za kemiju upisuje Diplomski nastavnički studij kemije. Od 2013. godine zaposlena je kao viši laborant na Odjelu za kemiju, Sveučilišta J.J. Strossmayera u Osijeku.

Za vrijeme studija sudjeluje na XXIII. Hrvatskom skupu kemičara i kemijskih tehnologa kao koautor s prezentacijom na posteru na temu *Škrob kao klatrat – direktno potenciometrijsko određivanje*, te na 7th International Congress Flour-Bread '13 s prezentacijom na posteru na temu *Starch Characterisation Using Spectrophotometry and Direct Potentiometry* u sklopu kojega je objavljen i istoimeni rad u Proceedings of the 7th International Congress Flour-Bread '13 (p. 322-326).